

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/000737

International filing date: 21 January 2005 (21.01.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: PCT/JP2004/000504  
Filing date: 21 January 2004 (21.01.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 10 March 2005 (10.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

PCT/JP2005/000737

日 本 国 特 許 庁 24.01.2005  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類は下記の出願書類の謄本に相違ないことを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application:

2004年 1月21日

出 願 番 号  
Application Number:

PCT/JP2004/000504

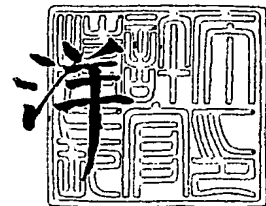
出 願 人  
Applicant(s):

和光純薬工業株式会社  
河野直幸  
上森仁志  
西部隆宏  
平安一成  
小林義輝

2005年 2月24日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



出証平 17-500071

## 受理官庁用写し

F1569WAKOPAT

1/5

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用)

0	受理官庁記入欄	
0-1	国際出願番号	PCT/JP2004/000504
0-2	国際出願日	21.1.2004
0-3	(受付印)	PCT International Application 日本国特許庁
0-4	様式-PCT/RO/101 この特許協力条約に基づく国際出願願書は、	
0-4-1	右記によって作成された。	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.50 (Build 0002.153)
0-5	申立て 出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。	
0-6	出願人によって指定された受理官庁	日本国特許庁 (RO/JP)
0-7	出願人又は代理人の登録記号	F1569WAKOPAT
I	発明の名称	蛋白質の固定化方法及び定量方法
II	出願人	
II-1	この欄に記載した者は	出願人である (applicant only)
II-2	右の指定国についての出願人である。	米国を除く全ての指定国 (all designated States except US)
II-4ja	名称	和光純薬工業株式会社
II-4en	Name:	WAKO PURE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.
II-5ja	あて名	5408605 日本国 大阪府大阪市中央区道修町三丁目1番2号
II-5en	Address:	1-2, Doshomachi 3-chome Chuo-ku Osaka-shi Osaka 5408605 Japan
II-6	国籍(国名)	日本国 JP
II-7	住所(国名)	日本国 JP
II-8	電話番号	06-6203-3165
II-9	ファクシミリ番号	06-6233-3717
II-11	出願人登録番号	000252300

F1569WAKOPAT

2/5

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用)

III-1 III-1-1 III-1-2 III-1-4ja III-1-4en III-1-5ja	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は 右の指定国についての出願人である。 氏名(姓名) Name (LAST, First): あて名	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only) 河野 直幸 KOHNO Naoyuki 6610963 日本国 兵庫県尼崎市高田町 6 番 1 号 6-1, Takada-cho Amagasaki-shi Hyogo 6610963 Japan 日本国 JP 日本国 JP
III-1-5en III-1-6 III-1-7	Address: 国籍(国名) 住所(国名)	6-1, Takada-cho Amagasaki-shi Hyogo 6610963 Japan 日本国 JP 日本国 JP
III-2 III-2-1 III-2-2 III-2-4ja III-2-4en III-2-5ja	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は 右の指定国についての出願人である。 氏名(姓名) Name (LAST, First): あて名	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only) 上森 仁志 UEMORI Hitoshi 6610963 日本国 兵庫県尼崎市高田町 6 番 1 号 6-1, Takada-cho Amagasaki-shi Hyogo 6610963 Japan 日本国 JP 日本国 JP
III-2-5en III-2-6 III-2-7	Address: 国籍(国名) 住所(国名)	6-1, Takada-cho Amagasaki-shi Hyogo 6610963 Japan 日本国 JP 日本国 JP
III-3 III-3-1 III-3-2 III-3-4ja III-3-4en III-3-5ja	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は 右の指定国についての出願人である。 氏名(姓名) Name (LAST, First): あて名	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only) 西部 隆宏 NISHIBU Takahiro 6610963 日本国 兵庫県尼崎市高田町 6 番 1 号 6-1, Takada-cho Amagasaki-shi Hyogo 6610963 Japan 日本国 JP 日本国 JP
III-3-5en III-3-6 III-3-7	Address: 国籍(国名) 住所(国名)	6-1, Takada-cho Amagasaki-shi Hyogo 6610963 Japan 日本国 JP 日本国 JP

F1569WAKOPAT

3/5

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用)

III-4 III-4-1 III-4-2 III-4-4a III-4-4en III-4-5a	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は 右の指定国についての出願人である。 氏名(姓名) Name (LAST, First): あて名	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only) 平安 一成 HIRAYASU Kazunari 6610963 日本国 兵庫県尼崎市高田町 6 番 1 号 6-1, Takada-cho Amagasaki-shi Hyogo 6610963 Japan
III-4-6 III-4-7	国籍(国名) 住所(国名)	日本国 JP 日本国 JP
III-5 III-5-1 III-5-2 III-5-4a III-5-4en III-5-5a	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は 右の指定国についての出願人である。 氏名(姓名) Name (LAST, First): あて名	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only) 小林 義輝 KOBAYASHI Yoshiteru 5408605 日本国 大阪府大阪市中央区道修町三丁目 1 番 2 号 1-2, Doshomachi 3-chome, Chuo-ku Osaka-shi Osaka 5408605 Japan
III-5-6 III-5-7	国籍(国名) 住所(国名)	日本国 JP 日本国 JP
IV-1 IV-1-1a IV-1-1en IV-1-2a	代理人又は共通の代表者、通知のあて名 代理人又は共通の代表者が選任されておらず、下記枠内に特に通知が送付されるあて名を記載している 名称 Name: あて名	通知のあて名 和光純薬工業株式会社 WAKO PURE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. 1030023 日本国 東京都中央区日本橋本町二丁目 1 番 7 号 1-7, Nihonbashi-honcho 2-ohome, Chuo-ku Tokyo 1030023 Japan
IV-1-2en IV-1-3 IV-1-4	Address: 電話番号 ファクシミリ番号	03-3244-0315 03-5200-2282
V V-1	国の指定 この願書を用いてされた国際出願は、規則 4.9(a)に基づき、国際出願の時点で拘束される全てのPCT締約国を指定し、取得しうるあらゆる種類の保護を求め、及び該当する場合には広域と国内特許の両方を求める国際出願となる。	

F1569WAKOPAT

4/5

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用)

VI-1	優先権主張	なし (NONE)	
VII-1	特定された国際調査機関(ISA)	日本国特許庁 (ISA/JP)	
VIII	申立て	申立て数	
VIII-1	発明者の特定に関する申立て	-	
VIII-2	出願し及び特許を与えられる国際出願日における出願人の資格に関する申立て	-	
VIII-3	先の出願の優先権を主張する国際出願日における出願人の資格に関する申立て	-	
VIII-4	発明者である旨の申立て(米国を指定国とする場合)	-	
VIII-5	不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て	-	
IX	照合欄	用紙の枚数	添付された電子データ
IX-1	願書(申立てを含む)	5	-
IX-2	明細書	56	-
IX-3	請求の範囲	4	-
IX-4	要約	1	✓
IX-5	図面	8	-
IX-7	合計	74	
IX-8	添付書類 手数料計算用紙	添付 ✓	添付された電子データ -
IX-17	PCT-SAFE 電子出願	-	✓
IX-19	要約書とともに提示する図の番号		
IX-20	国際出願の使用言語名	日本語	
X-1	出願人、代理人又は代表者の記名押印		
X-1-1	氏名(姓名)	和光純薬工業株式会社 池添 太 代表者	
X-1-2	署名者の氏名		
X-1-3	権限		
X-2	出願人、代理人又は代表者の記名押印		
X-2-1	名称	河野, 直幸	
X-2-2	署名者の氏名		
X-2-3	権限		
X-3	出願人、代理人又は代表者の記名押印		
X-3-1	名称	上森, 仁志	
X-3-2	署名者の氏名		
X-3-3	権限		
X-4	出願人、代理人又は代表者の記名押印		
X-4-1	名称	西部, 隆宏	
X-4-2	署名者の氏名		
X-4-3	権限		



F1569WAKOPAT

5/5

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用)

X-5	出願人、代理人又は代表者の記名押印	
X-5-1	名称	平安, 一成
X-5-2	署名者の氏名	
X-5-3	権限	
X-6	出願人、代理人又は代表者の記名押印	
X-6-1	名称	小林, 義輝
X-6-2	署名者の氏名	
X-6-3	権限	

## 受理官庁記入欄

10-1	国際出願として提出された書類の実際の受理の日	21. 1. 2004
10-2	図面	
10-2-1	受理された	
10-2-2	不足図面がある	
10-3	国際出願として提出された書類を補充する書類又は図面であってその後期間内に提出されたものの実際の受理の日(訂正日)	
10-4	特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補充の期間内の受理の日	
10-5	出願人により特定された国際調査機関	ISA/JP
10-6	調査手数料未払いにつき、国際調査機関に調査用写しを送付していない	

## 国際事務局記入欄

11-1	記録原本の受理の日	
------	-----------	--

## 明 細 書

## 蛋白質の固定化方法及び定量方法

## 技術分野

- 5 本発明は、固相への蛋白質の新規な固定化方法、それを用いた蛋白質の定量方法、イムノブロッティング方法並びに蛋白質固定化用試液、更には該固定化方法を用いた異常型プリオン蛋白質の検出方法及びプリオン病（特に牛海綿状脳症、Bovine Spongiform Encephalopathy、以下BSEと略記する。）の判定方法等に関するものである。

10

## 技術背景

- 蛋白質の定量は、従来、溶液内で蛋白質の化学的反応性の高い部分と蛋白質反応試液とを反応させたり [Lowry, O.H. et al., J. Biol. Chem., 193: 265-275 (1951), Smith, P.K. et al., Anal. Biochem., 150: 76-85 (1985)]、蛋白質と特異的に吸着する色素試液と反応させることで [Bradford, M., Anal. Biochem., 72: 248-254 (1976), Watanabe, N. et al., Clin. Chem., 32: 1551-1554 (1986)]、溶液の吸光度を変化させ、その吸光度変化に基づいて測定する方法、いわゆる液相法が主流であった。しかしながら、生化学的サンプルには、通常、蛋白質の他、非蛋白質性生
- 15 体成分や緩衝剤、塩類、酸化防止剤、キレート剤、糖類、有機溶媒、人工ポリマー、界面活性剤等多数の物質が共存しており、多くのサンプルでは、これらの共存物質が原因となって蛋白質と蛋白質測定試液の相互作用（反応・結合）を阻害し、正確な蛋白質の測定ができない場合が多々ある。そこで、蛋白質を膜等の固相面に吸着させ、上記共存物質のよう
- 20 な蛋白質測定に対する阻害物質を洗い流し、固相面に滞留した蛋白質を
- 25 蛋白質測定試液で反応させ定量する方法、いわゆる固相化法が開発され



た [Kuno, H. et al., Nature, 215:974-975 (1967)、Gates, R., Anal. Biochem., 196:290-295 (1991)、Said-Fernandez, S. et al., Anal. Biochem. 191:119-126 (1990)、Ghosh, S. et al., Anal. Biochem. 169:227-233 (1988)、Lim, M. K. et al., BioTechniques 21:888-895 (1996)]。

しかしながら、これらの蛋白質の膜固定化方法は、阻害物質を除去することはできるが、一定の割合で蛋白質を膜に固定化することができず、やはり正確な蛋白質の定量を行えないため、問題解決には至っていない。

一方で、蛋白質の固定化法として蛋白質変性・チャージ中和作用のあるトリクロロ酢酸や酢酸溶液、酢酸／メタノール溶液を夫々固定化溶液として用いる方法が古くから行われている。しかし、蛋白質によっては十分な固定化ができない場合があるため、蛋白質の測定を定量的に行えない。そのため、新たな蛋白質の固定化／定量方法の開発が望まれている現状にあった。

ところで、BSE、ヒツジのスクレイピー及びヒトのクロイツフェルト・ヤコブ病に代表されるプリオン病は、プリオン蛋白質 (Prion Protein、以下、PrP と略記する。) が異常化し、脳の組織がスポンジ状になり、運動失調などの神経症状を引き起こす病気である。PrP の遺伝子自体はウシだけでなく、ヒトやヒツジ、ネコ等、ほ乳類が普通に持っている。正常な個体の正常組織に存在する PrP (以下、正常型 PrP と記載する。) は、プロテイナーゼ K で容易に分解される。しかし、BSE 等の疾患で見られる PrP は、蛋白質分解酵素や、加熱、紫外線照射などの物理化学的処理にも抵抗性であるという特徴を有する (この PrP を以下、異常型 PrP と記載する)。BSE では、この異常型 PrP が脳内に蓄積され、細胞が死滅することで脳がスポンジ状になり神経障害を引き起こすことが知

られている。

プリオン病の判定は、異常型 PrP を検出することにより行われるが、異常型 PrP の検出方法としては、ELISA 法とウェスタン・ブロット法が知られている。

- 5     ELISA 法による異常型 PrP の検出方法は、まず被検試料中の PrP のうち正常型 PrP を酵素処理等により分解し、異常型 PrP のみにしたのち、ELISA 用プレートに結合した抗 PrP 抗体(一次抗体)、次いで標識物質で標識した抗 PrP 抗体(二次抗体)と反応させ、異常型 PrP に結合した抗 PrP 抗体の標識を発色させて測定するというものである。この方法では、
- 10    は、異常型 PrP のみと抗 PrP 抗体を結合させるために、予め正常型 PrP と他の蛋白質を完全に分解させる必要があるが、実際には正常型 PrP やその他の蛋白質が完全には分解されずに、残ったこれらの蛋白質が抗 PrP 抗体と結合する場合があります(偽陽性判定がされる原因)、異常型 PrP を特異的に検出することが困難であるという問題がある。
- 15    またウェスタン・ブロット法による判定方法は、ELISA 法の場合と同様に被検試料中の PrP のうち正常型 PrP を分解した後、電気泳動を行う。分離した電気泳動分画をシートに転写し、異常型 PrP と結合して発色する試薬を添加し、その発色を測定する方法である。この方法では、電気泳動を行うことで、被検試料中の蛋白質を分子量別に分類できるので、被検試料中に正常型 PrP やその他の蛋白質があったとしても、異常
- 20    型 PrP 画分だけを判別することが出来る。しかしながら、ウェスタン・ブロット法では、電気泳動の結果を得るために数時間を要し、また一度に泳動できる検体数が限られているという問題がある。

そのため、より迅速且つ精度の高い異常型 PrP の検出方法及びプリオン病の判定方法が望まれている現状にあった。

25

- 本発明は、これら上記した如き状況に鑑みなされたもので、従来の固相化法では容易に固定化できなかった試料中の蛋白質を固相に固定化でき、且つ試料中に共存する阻害物質の影響を軽減して蛋白質の定量的測定／検出を行うことができる固定化方法、それを用いた蛋白質の定量方法、
- 5 イムノプロットティング方法並びに蛋白質固定化用試液、更には該固定化方法を用いた異常型 PrP の迅速且つ精度の高い検出方法及びプリオン病（特に BSE）の判定方法等を提供することを課題とする。

#### 発明の開示

- 10 本発明は、上記課題を解決する目的でなされたものであり、以下の構成よりなる。
- （１）低級アルコールと、ハロゲンカルボン酸及び／又は長鎖アルキル硫酸塩の共存下で、蛋白質を、疎水性表面を有する固相と接触させることを特徴とする、当該蛋白質の当該固相への固定化方法。
- 15 （２）上記（１）の方法により蛋白質が固定化された固相に蛋白質染色液を接触させ、それにより生じた発色の程度に基づいて行うことを特徴とする、蛋白質の定量方法。
- （３）上記（１）の方法により蛋白質が固定化された固相を用いることを特徴とする、イムノプロットティング方法。
- 20 （４）異常型 PrP を含有する被検試料を、上記（１）の方法により処理して異常型 PrP を当該固相に固定化させた後、異常型 PrP に結合し得る抗体を反応させ、それにより生じた抗原抗体複合物の量を測定し、その結果に基づいて行うことを特徴とする、異常型 PrP の検出方法。
- （５）上記（４）の方法により異常型 PrP 蛋白質を検出し、その結果に基づいて行う、プリオン病の判定方法。
- 25 （６）低級アルコールと、ハロゲンカルボン酸及び／又は長鎖アルキル

硫酸塩とを含有する、蛋白質固定化用試液。

- (7) 低級アルコールと、ハロゲノカルボン酸及び／又は長鎖アルキル硫酸とを含有する固定化用試液 1、(2) 低級アルコール、ハロゲノカルボン酸及び非イオン性界面活性剤を含有する固定化用試液 2、及び(3) 異常型 PrP と特異的に結合し得る標識抗体、を構成試薬として含有してなる、異常型 PrP 検出用キット。

- 即ち、本発明者等は、従来の固相化法では蛋白質の固定化がうまく行かない要因について検討を行ったところ、その最大の要因は、蛋白質を固相に固定化する段階で、目的の蛋白質を十分に（一定の割合で）固相に固定化できないために、蛋白質の定量的な測定が行えないのが原因であるということを見出した。

- そこで、固定化を効率よく行う方法について更に検討を行った結果、エタノール等の低級アルコール類と、トリクロロ酢酸等のハロゲノカルボン酸の共存下に蛋白質の固定化を行うと、固相に蛋白質を十分に固定化できることを見出した。

- また、界面活性剤のうち、長鎖アルキル硫酸塩が蛋白質の固定化にユニークな特性を持つことを見出した。即ち、長鎖アルキル硫酸塩を、低級アルコール、又は低級アルコールとハロゲノカルボン酸とが存在する条件下で蛋白質の固定化を行うと、蛋白質の吸引・ろ過を行う過程で、蛋白質に何らかの影響を及ぼし、その結果、蛋白質の膜吸着を促進し安定化する一方、阻害物質等の共存物質を膜固相面から排除するように働く（阻害物質の膜滞留を抑える）ことが明らかとなった。長鎖アルキル硫酸塩のこうした働きは、蛋白質含有固定化用試料溶液をマイクロプレートウェル等の固相面に静置した場合でも起こり得る。

一般的に非イオン性界面活性剤等の界面活性剤は、疎水性物質の吸着を阻害する性質を有しており、一方、蛋白質と膜の結合は疎水結合によると考えられている。そのため、これまで界面活性剤が蛋白質の固定化時に好んで用いられることはなく、それ故に界面活性剤の持つ蛋白質に対する作用と、作用を受けた蛋白質の固相面に対する相互作用を詳細に論じた報告は殆ど無い。そのため、界面活性剤の一種である長鎖アルキル硫酸塩が、蛋白質の固定化に有効であるということは今まで知られていなかった。

従って、長鎖アルキル硫酸塩を、従来から蛋白質固定化に用いられていた低級アルコール類、若しくは低級アルコールとハロゲンカルボン酸と共存させることで、蛋白質を十分に固相に固定化できるということは、本発明者らが初めて見出したことである。更に、従来の固相法では界面活性剤が共存する試料中の蛋白質を効率よく固定化することができなかったため、このような試料については蛋白質の定量も行えなかったが、本発明の固定化法によれば、そのような試料中の蛋白質も効率よく固定化することができ、極めて有効な、利用価値の高い蛋白質固定化方法を完成した。

更に、当該蛋白質固定化方法を用いて異常型 PrP を検出し、その結果を基にプリオン病の判定を行えば、従来の ELISA 法やウェスタン・ブロット法よりも迅速で高精度の判定が行えるのではないかと考え、鋭意研究の結果、従来の組織試料の調製方法及び本発明に係る蛋白質固定化方法を利用することによって、従来の ELISA 法に比較して偽陽性が出ずに精度良く判定が行え、また従来のウェスタン・ブロット法に比較して判定に要する時間を  $1/3$  に短縮することができることを見出し、本発明を完成した。

尚、本発明に於いて、蛋白質の固定化法という場合、蛋白質を固相に固定化する方法をいい、固相法による蛋白質の測定又は定量という場合は、本発明に係る固定化方法で蛋白質を固相に固定化した後、蛋白質の測定又は定量を行うことを意味する。

5

#### 図面の簡単な説明

図1は、実施例1において得られた、各固定化用試料中の蛋白質を固定化したポリビニリデンジフロライド膜（PVDF膜）を Pyromolex 試液で染色した後、600nm における吸光度（シグナル強度）を測定した結果を示す。

10

図2は、実施例2に於いて得られた、各固定化用試料中の蛋白質を固定化した PVDF 膜を Pyromolex 試液で染色した後、600nm における吸光度（シグナル強度）を測定した結果を示す。

図3は、実施例3に於いて得られた、各固定化用試料中の蛋白質を固定化した PVDF 膜を Pyromolex 試液で染色した後、600nm に於ける吸光度（シグナル強度）を測定した結果を示す。

15

図4は、実施例4に於いて得られた、各固定化用試料中の蛋白質を固定化した PVDF 膜を Pyromolex 試液で染色した後、600nm に於ける吸光度（シグナル強度）を測定した結果を示す。

図5は、実施例5に於いて得られた、蛋白質試料として卵白アルブミン（OVA）を用いて、PVDF膜に固定化、定量を行って得られた検量線を示す。

20

図6は、実施例6に於いて得られた、固相法により蛋白質を測定した結果又は液相法により蛋白質を測定した結果に基づいて得られた相対値を示す。

25

図7は、実施例7に於いて得られた、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）

8

を含有しない IgG 試料又は SDS 含有する IgG 試料を蛋白質試料として用い、本発明に係る固定化、蛋白質の定量を行って得られた検量線を示す。

図 8 は、実施例 10 に於いて得られた、イムノプロットティングの結果を示し、A は PVDF 膜に固定化した蛋白質試料の免疫検出を発光反応により行い、X 線フィルムに感光させ検出したものである。B は、PVDF 膜に固定化した蛋白質試料の免疫検出を発色反応により行い、検出したものである。

#### 発明を実施するための最良の形態

10 本発明に係る低級アルコールとしては、メタノール、エタノール、プロパノール等が挙げられ、中でもエタノール又はメタノールが好ましい。

本発明に係るハロゲノカルボン酸のハロゲン原子としては、臭素、フッ素、塩素等が挙げられ、中でも塩素が好ましい。カルボン酸としては、  
15 酢酸、プロピオン酸等が挙げられ、中でも酢酸が好ましい。このようなハロゲノカルボン酸としては、例えばトリクロロ酢酸 (TCA)、トリフロロ酢酸 (TFA) 等が挙げられる。

本発明に係る長鎖アルキル硫酸塩の長鎖アルキル基としては、炭素数  
20 7~25 のものが好ましく、中でも 8~15 が好ましい。より好ましくはドデシル基である。また、硫酸塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩等が好ましく、中でもナトリウム塩が好ましい。このような長鎖アルキル硫酸塩の具体例としては、例えばドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 等が挙げられる。

25

本発明に係る固定化方法に於いて、蛋白質を低級アルコールと、ハロ

ゲノカルボン酸及び／又は長鎖アルキル硫酸塩と共存させる方法としては、蛋白質を、疎水性表面を有する固相と接触させる際に、当該蛋白質が低級アルコールと、ハロゲノカルボン酸及び／又は長鎖アルキル硫酸塩と共存している状態にできるものであれば、どのような方法でも良い。

- 5 例えば、(1) 蛋白質を含有する試料と、低級アルコールを含有する溶液と、ハロゲノカルボン酸を含有する溶液及び／又は長鎖アルキル硫酸塩を含有する溶液を混合する方法、(2) 蛋白質を含有する試料と、低級アルコールと、ハロゲノカルボン酸及び／又は長鎖アルキル硫酸塩を直接混合する方法等が挙げられるが、特に限定されるものではない。

10

低級アルコールを含有する溶液、長鎖アルキル硫酸塩を含有する溶液及びハロゲノカルボン酸を含有する溶液を調製する際に用いられる溶液としては、例えば精製水、緩衝液等が挙げられ、緩衝液を構成する緩衝剤としては、例えば MOPS, HEPES 等のグッド緩衝剤、トリス (Tris)

- 15 緩衝剤、リン酸緩衝剤、ペロナール緩衝剤、ホウ酸緩衝剤等、通常この分野で用いられている緩衝剤が挙げられるが、なるべく蛋白質の固定化や測定に対する影響を回避するために、精製水を用いるのが好ましい。

- 20 蛋白質と疎水性表面を有する固相とを接触させる固定化用試料中の各試薬の好ましい濃度としては、低級アルコール濃度が 30~50 V/V%、好ましくは 35~50 W/V%、ハロゲノカルボン酸濃度が 0.08~10 W/V%、好ましくは 0.5~5 W/V%、長鎖アルキル硫酸塩濃度が 0.1~1 W/V%、好ましくは 0.1~0.4 W/V% である。

- 25 本発明に係る疎水性表面を有する固相としては、例えば疎水性表面を有する膜、疎水性表面を有するプレート等が挙げられる。疎水性表面を有する膜の具体例としては、例えば疎水性膜であるポリビニリデンジフ



ロライド膜 (PVDF 膜)、ニトロセルロース膜、濾紙等が挙げられ、疎水性表面を有するプレートの具体例としては、例えば通常 ELISA 等によく用いられるプラスチックプレート等が挙げられる。

- 5 蛋白質を、疎水性表面を有する固相と接触させる方法としては、上記方法により調製した、蛋白質と、低級アルコールと、ハロゲノカルボン酸及び／又は長鎖アルキル硫酸塩を含有する固定化用試料を、当該疎水性表面を有する固相と接触させればよい。例えば固定化用試料を当該固相上に滴下する、塗布する等の方法がある。

10

当該固相として疎水性膜を用いる場合には、当該疎水性膜上に当該固定化用試料を滴下等した後、静置して当該疎水性膜に当該固定化用試料を浸透させるか、又は固定化用試料を、当該疎水性膜を通して吸引濾過する、通常のフィルトレーション法、或いは遠心濾過法による方法を用

- 15 いれば良い。

フィルトレーション法による蛋白質の固定化方法を、市販のドットブロッターもしくはスロットブロッターを用いる方法を例に挙げて具体的に説明すると、以下の通りである。

- 20 まず、メタノール、次いで蒸留水に浸した PVDF 膜等の疎水性膜及び要すればその上に蒸留水に浸した濾紙となるようにドットブロッターにセットする。次に、一定量の蛋白質と低級アルコール、長鎖アルキル硫酸塩及び／又はハロゲノカルボン酸を含有する固定化用試料（最大 400  $\mu$ L）をドットブロッターのウェルにアプライし、真空ポンプで、約  
25 15Kpa 程度の引圧でゆっくり吸引する（フィルトレーションする）と、固定化用試料中の蛋白質は PVDF 膜に吸着される。固定化試料を完全に

吸引した後、洗浄液を各ウェルにアプライし、吸引する。次いで、ドットプロッターから PVDF 膜を取り出し、ペーパータオル、濾紙等の上に乗せ、約 30 分以上かけて真空乾燥を行う。

- 5      蛋白質が吸着し易いか否かは、その蛋白質の疎水性と固相膜面の疎水性の関係により決まる。例えばその条件下で吸着し易い蛋白質は、速く吸引した場合も十分吸着されるが、中程度もしくは弱い吸着性しか示さない蛋白質の吸着の程度は吸引速度に大きく影響される。従って、目的の蛋白質を十分吸着させるためには、一般にゆっくり吸引することが好ましい。例えば 10 分以上をかけて吸引することが好ましい。
- 10

当該固相として、疎水性表面を有するプレートを用いる場合には、例えば当該プレート上に当該固定化用試料を滴下又は塗布等した後、静置して自然乾燥させる方法等を行えばよい。

15

蛋白質の定量を行うには、蛋白質を固定化した固相を通常の蛋白質定量方法に付し、試料中の蛋白質量を測定すればよい。

- 本発明に係る蛋白質の定量方法としては、上記方法により蛋白質を固相に固定化させた後、蛋白質染色液として例えばアミノブラック、ピロガロールレッド - モリブデン酸複合体 (Pyromolex) 溶液を用いた方法、クマシーブリリアントブルー (CBB)-G250 を用いたブラッドフォード法、ピシンコニン酸を用いた BCA 法等によって染色を行い、生じた発色の程度を測定することによって行う、自体公知の蛋白質測定方法によって測定を行えばよい。
- 20
- 25

実際の定量には、測定しようとする蛋白質毎に、蛋白質濃度既知の蛋白質試料を用いて同様に固定化、染色、測定を行い、検量線を作成しておく。そして、その検量線をもとに、試料中の蛋白質濃度を決定する。

- 5      例えば、Pyromolex 発色法による定量方法を例にとって説明すると、  
先ず、蛋白質試料中の蛋白質を本発明の方法により PVDF 膜に固定化させた後、PVDF 膜を精製水又はリン酸緩衝食塩水 (PBS) 等の緩衝液で洗淨する。要すれば室温で 30 分程度真空乾燥させた後、Pyromolex 含有染色試液に 20~35 分程度浸漬させて、発色させる。その後、デンシ  
10   トメーター、CCD カメラ等により 600nm の吸光度を測定する。得られた吸光度を、予め濃度既知の蛋白質試料を用いて同様に蛋白質の固定化、測定を行って得られた検量線から、蛋白質の濃度を決定すればよい。

- 尚、蛋白質の固定化、蛋白質濃度測定通の各工程の間に固相の洗淨処理操作を行うのは任意であるが、行うことが好ましい。その際の洗淨液  
15   としては、精製水又は PBS 等の緩衝液等が用いられる。

- 本発明に係るイムノプロットイング方法としては、本発明の方法によって固相に蛋白質を固定化させる以外は、当該蛋白質に対する抗体や標識抗体を用いて抗原抗体反応による当該蛋白質の測定／検出を行う、通常  
20   のイムノプロットイング方法が適用できる。本発明に係る固定化方法を行えば、蛋白質を効率的に固相に固定化できるので、本発明に係るイムノプロットイング方法によれば、従来よりも感度よく蛋白質の検出及び分析を行うことができる。

- 25      本発明の固定化方法によって固定化できる蛋白質は、従来の固相化法によって固定化されていた蛋白質は全て挙げられるが、例えば血液、血

清、血漿、髄液等の各種体液や尿、リンパ球、血球、細胞類等の生体由来の試料中に含まれる蛋白質が挙げられる。

具体的には、例えばリゾチーム、チトクローム c、DNase 等の酵素、IgG、IgM、IgE 等の抗体、フィブリノーゲン等の糖蛋白質、ウシ血清アルブミン (BSA)、ヒト血清アルブミン (HAS) 等の血清蛋白質、卵白アルブミン (OVA)、PrP 等の蛋白質、トリプシンインヒビター等のインヒビター、インシュリン等のホルモン等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

10 尚、本発明は、例えば従来の固相化法では固相に充分固定化できなかったチトクローム c 等の塩基性蛋白質をも固定化することができ、蛋白質の定量を行える点で、特に有効である。

本発明に係る蛋白質の固定化方法に於いて、固相に固定化できる蛋白質の濃度上限は、例えば、固相が膜の場合約  $500 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  程度、固相がマイクロプレートの場合約  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  程度であるので、固定化用試料中の蛋白質の量は、固定化する固相の種類に応じて、その最大保持能を超えないように、調製することが望ましい。

20 本発明に係る異常型 PrP の検出方法は、異常型 PrP を含有する被検試料を、本発明に係る蛋白質の固定化方法により処理して異常型 PrP を当該固相に固定化させた後、異常型 PrP に結合し得る抗体を反応させ、それにより生じた抗原抗体複合物の量を測定し、その結果に基づいて行う方法である。

25

本発明に係る異常型 PrP の検出方法に用いられる異常型 PrP を含有

する被検試料の調製方法は、従来の BSE の判定方法に於いて行われている、動物組織由来の試料の調製方法に従って行ってもよい。

即ち、異常型 PrP を検出すべき動物組織を、適当な緩衝液や糖類溶液中でホモジナイズし、得られたホモジネートをプロティナーゼ K で処理して正常型 PrP を分解させる。次いで反応物に蛋白質沈降剤を加えて異常型 PrP を沈殿させ、沈殿物を適当な溶媒（緩衝液、尿素水溶液等）に溶解して、ELISA 又はウェスタン・ブロッティングに付すという方法である。

10

但し、下記工程による調製方法で異常型 PrP を検出すべき動物組織を処理すれば、上記した従来法よりも、効率よく動物組織から異常型 PrP を抽出することが出来る。

即ち、

- 15 1) 異常型 PrP を検出すべき動物組織を界面活性剤の存在下に破碎処理する工程、
  - 2) 不溶物を除去する工程、
  - 3) 上清に分解酵素を加えて正常型 PrP を分解する工程、
  - 4) 異常型 PrP を沈降させる工程、
  - 20 5) 沈降物を回収したのち、沈降物の溶液を得る工程、
- である。

上記工程 1) に於いて用いられる界面活性剤としては、SDS、ラウリルベンゼンスルホン酸、デオキシコール酸、コール酸、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンドデシルサルフェイト(Tris DS)等の陰イオン性界面活性剤、ポリオキシエチレンセチルエーテル、ポリオキシエチレ

25

ンラウリルエーテル等のポリオキシエチレンアルキルエーテル類、例えばポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル (Triton X-100、ローム・ソノダハス社商品名)等のポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル類、例えばポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート、ポリオキシエチレンソルビタンモノパルミテート、ポリオキシエチレンソルビタンモノステアレート、ポリオキシエチレンソルビタントリオレート等のポリオキシエチレンアルキルエステル類、例えばオクタノイル-N-メチルグルカミド、ノナノイル-N-メチルグルカミド、デカノイル-N-メチルグルカミド等のメチルグルカミド誘導体、例えば n-オクチル-β-D-グルコシド等のアルキル糖誘導体等の非イオン界面活性剤等が挙げられる。中でも Triton X-100、デオキシコール酸が好ましい。これらは単独又は二種以上混合して用いられる。

動物組織を界面活性剤の存在下に破碎処理する方法としては、動物組織を破碎処理する際に界面活性剤が共存するように、動物組織に界面活性剤又はこれを含むホモジナイズ用溶液を添加しても、またその逆に界面活性剤又はホモジナイズ用溶液に動物組織を加えても良い。

工程 1) に於いて用いられる界面活性剤の濃度は、ホモジナイズされた時のホモジネート中の濃度が 0.015~15.6W/V%、好ましくは 0.078~7.8W/V% である。また、ホモジナイズ用溶液中の濃度として、0.02~20W/V%、好ましくは 0.1~10W/V% である。

尚、当該ホモジナイズ溶液中には上記界面活性剤の他に例えばトリス緩衝剤、リン酸緩衝剤、ペロナール緩衝剤、ホウ酸緩衝剤、グッド緩衝剤等の緩衝剤、糖類、NaCl 等の塩類、界面活性剤、防腐剤、蛋白質等が含まれていても良い。

上記工程 2) に於ける不溶物を除去する方法としては、不溶物を分離

除去することが出来る方法で有れば良く、遠心分離による方法が簡便である。

上記工程 3) に於いて用いられる分解酵素としては、正常型 PrP を分解するが異常型 PrP を分解しない性質を持つ酵素であればよい。例えば  
5 従来の異常型 PrP の検出に於いて用いられるプロテイナーゼ K 等が挙げられる。その濃度及び分解反応時の条件等は、分解酵素が正常型 PrP を分解できる条件、濃度であればよい。

10 上記工程 4) に於いて異常型 PrP を沈降させるために用いられる蛋白質沈降剤としては、異常型 PrP を沈降させる性質を持つものであれば良く、従来の異常型 PrP の検出に於いて用いられるものを使用すればよいが、例えば 3-ブタノール、2-ブタノールとメタノールの混合溶媒等が挙げられる。

15

工程 5) に於いて沈降物を回収する方法としては、上清を除いて沈殿した異常型 PrP を回収できる方法で有れば良く、遠心分離による方法が簡便である。

また、工程 5) に於いて沈降物の溶液を得るには、沈降物を適当な沈  
20 降物溶解液中に溶解すればよい。

沈降物溶解液を構成する溶媒としては、異常型 PrP が固相上に吸着或いは結合するのを妨げる性質を有するものでなければ良く、例えば精製水、例えばトリス緩衝液、リン酸緩衝液、ペロナール緩衝液、ホウ酸緩衝液、グッド緩衝液等、この分野で普通に用いられている緩衝液は全て  
25 挙げられる。緩衝液の pH としては抗原抗体反応を抑制しない範囲であれば特に限定されないが、通常 5~9 の範囲が好ましい。

また、これらの緩衝液中の緩衝剤濃度としては、通常 10~500mM、好ましくは 10~300mM の範囲から適宜選択される。また、この溶解液中には、抗 PrP 抗体が固相上に吸着或は結合するのを妨げない量であれば、例えば糖類、NaCl 等の塩類、界面活性剤、防腐剤、蛋白質等が含まれていても良い。

更に、沈降物溶解液中には、工程 3) の分解酵素を失活させ、異常型 PrP を不活性化させる（病原性-感染性を失わせる）ために、例えば尿素、SDS、蟻酸、チオシアン酸グアニジン、塩酸グアニジン、三塩化酢酸、フェノール等の界面活性剤、酸化剤又は蛋白質変性剤を共存させておく必要がある。その濃度は、沈降物溶解液中の濃度として 0.5%W/V% 以上、好ましくは 2%W/V% 以上である。

尚、分解酵素を失活させる為、この分野で用いられる加熱処理を行っても良い。

また、工程 1) ~ 5) の各工程に於いて使用するその他の試薬、器具類や、処理条件等（反応温度、反応時間等）は、すべて自体公知の上記した如き異常型 PrP を検出すべき動物組織を処理する方法に準じて選択すればよい。

従来の BSE の判定方法における動物組織由来の試料の調製方法では、動物組織をホモジナイズ処理及びプロテイナーゼ K 処理後、蛋白質沈降剤により異常型 PrP を沈降させるが、ここに至るまでの過程でホモジネートを除去する操作を行わない。そのため得られた異常型 PrP を含有する被検試料中には、異常型 PrP 以外の多種の蛋白質も多量に共存することになり、抗 PrP 抗体の非特異的結合を起こさせ BSE の判定の際に偽陽性の判定をもたらす危険性が高くなる。



これに対し、上記工程 1) では、非イオン性界面活性剤等の界面活性剤の存在下に動物組織を破碎処理することにより、細胞膜を可溶化して細胞膜に結合した形で存在する PrP を細胞膜より遊離させることが出来る。そのため、次の工程 2) で沈殿物を除去する工程を行っても、PrP は組織片と一緒に沈殿してしまうことがないので、上清を回収すれば、PrP を含有し且つ動物組織片を含有しない溶液が得られる。この溶液について工程 3) を行えば、従来のホモジネートをそのまま酵素処理するよりも、効率よく正常型 PrP を分解出来るので、正常型 PrP を含有しない、且つ異常型 PrP を含有する被検試料を得ることができるのである。

また、工程 2) 及び 5) の工程に於いて異常型 PrP 以外の成分の除去操作が複数回行われることにより、動物組織片や異常型 PrP 以外の蛋白質が除かれるので、次の固定化処理の工程で、固相が目詰まりしてしまう危険性を排除できる。

更に工程 1) 及び 5) に於いて、被検試料を非イオン性界面活性剤と共存させることにより、測定対象でない他の蛋白質や、正常型 PrP を分解できる。一方異常型 PrP は変性、分解しにくい蛋白質なので、非イオン性界面活性剤の共存下でも変性、分解されない。そのため、固相への固定化方法を行った際に、分解された蛋白質は固相を通過してしまうが、分解されなかった異常型 PrP は固相上に残るので、異常型 PrP のみを固相に固定化することができるのである。

異常型 PrP を含有する被検試料中の異常型 PrP を固相に固定化させる方法は、本発明に係る蛋白質の固定化方法に従い、上記の方法により

調製した異常型 PrP を含有する被検試料から、低級アルコールと、ハロゲノカルボン酸及び／又は長鎖アルキル硫酸塩を含有する異常型 PrP 固定化用試料を調製し、当該疎水性表面を有する固相と接触させればよい。

5

当該方法に用いられる低級アルコール、ハロゲノカルボン酸、長鎖アルキル硫酸塩の具体例、これらを含有する溶液の調製方法及び当該溶液中の濃度、当該被検試料を低級アルコールと、ハロゲノカルボン酸及び／又は長鎖アルキル硫酸塩と共存させる方法等の好ましい態様及び具体例は、前記した通りである。

10

また、当該異常型 PrP 固定化用試料を疎水性表面を有する固相と接触させる方法に用いられる固相の具体例は前記した通りであるが、例えば疎水性膜である PVDF 膜、ニトロセルロース膜、濾紙等が好ましい。

15

異常型 PrP 固定化用試料を、疎水性表面を有する固相と接触させる方法及び接触させる条件等は前記した通りであるが、中でも、当該疎水性膜を通して吸引濾過する、通常のフィルトレーション法、或いは遠心濾過法による方法が、好ましい。これらの方法により、固相上には測定対象である異常型 PrP が固定化され、それ以外の蛋白質は固相を通過してしまうので、より効率的である。

20

当該方法では、異常型 PrP を固相に固定化するために試料を固相と接触させた後、1分～30分、好ましくは10分程度静置し、その後吸引濾過処理を行う。従来の ELISA 法によれば、ELISA 用プレートに蛋白質を固定化するために約 75 分程度静置する必要があったが、本発明の

25

方法によれば、この時間を大幅に短縮することが出来る。

5 フィルトレーション法による異常型 PrP の固定化方法を、市販のドットブロッターもしくはスロットブロッターを用いる方法を例に挙げて具体的に説明すると、以下の通りである。

まず、メタノール、次いで蒸留水に浸した PVDF 膜等の疎水性膜及び要すればその上に蒸留水に浸した濾紙となるようにドットブロッターにセットする。次に、例えば上記の方法で調製した、異常型 PrP、低級アルコール、長鎖アルキル硫酸塩及び／又はハロゲンカルボン酸を含有する異常型 PrP 固定化用試料（最大 400  $\mu$ L）をドットブロッターのウェルにアプライし、真空ポンプで、約 15Kpa 程度の引圧でゆっくり吸引する（フィルトレーションする）と、異常型 PrP 固定化用試料中の異常型 PrP は PVDF 膜に吸着される。溶液を完全に吸引した後、洗浄液を各ウェルにアプライし、吸引する。

15

異常型 PrP を固相に固定化するための吸引操作は、異常型 PrP を十分吸着させる条件で行えば良く、約 2Kpa~30Kpa 程度の引圧で吸引すればよい。吸引に要する時間、吸引速度等は特に制限されない。

20 異常型 PrP を含有する被検試料中の異常型 PrP を固相に結合させた後、吸引濾過することにより、固相に結合しなかった正常型 PrP やその他の蛋白質等の被検試料中の成分を除去することが出来、測定対象である異常型 PrP のみを固相に固定化することが出来る。

25 尚、固相上には抗体を変性させる畏れのある SDS が残存している。そこで、本発明に係る固定化方法では、固定化処理の後固相を精製水又は

- PBS 等の緩衝液で洗浄することを任意に行うことは先に述べた通りである。異常型 PrP を固相に固定化する方法に於いては、上記の吸引濾過の工程を行った後、非イオン性界面活性剤を含有する溶液で固相を洗浄する工程を更に追加して行うことにより、試料中の SDS を除き、続く異常型 PrP の検出工程に付することが好ましい。この方法では、①他の蛋白質は非イオン性界面活性剤により変性してしまう可能性があるが、異常型 PrP はこの処理では変性しないこと、②非イオン性界面活性剤が、固相に蛋白質を一様に広げる作用があることから、特に異常型 PrP のような変性しにくい蛋白質の固定化を行うには有効な方法である。
- 5 当該洗浄工程に用いられる溶液には、非イオン性界面活性剤の他に、低級アルコール及びハロゲンカルボン酸を含有していることが望ましい。
- 10 当該洗浄処理に用いられる、低級アルコール、ハロゲンカルボン酸及び非イオン性界面活性剤の好ましい具体例は上記した通りである。
- また、当該洗浄処理における洗浄剤（固定化用試液 2 とする）中の好ましい濃度としては、低級アルコール濃度が 80～50V/V%、好ましくは 30～50V/V%、ハロゲンカルボン酸濃度が 0.08～10W/V%、好ましくは 1～4 W/V% 非イオン性界面活性剤濃度が 0.01～10V/V%、好ましくは 0.04～2 V/V% 程度である。
- 15 本発明に係る異常型 PrP の検出方法に於いて、固相に固定化できる蛋白質の濃度上限は、前記した通りである。
- 20

本発明に係る異常型 PrP の検出方法に於いては、本発明の方法によって固相に異常型 PrP を固定化させる以外は、当該蛋白質に対する抗体や標識抗体を用いて自体公知の免疫測定法〔例えば酵素免疫測定法（E I A）、放射免疫測定法（R I A）、蛍光免疫測定法（F I A）等〕の測定

25

操作法に準じて以上型 PrP の測定／検出を行う、通常のイムノブロッティング方法が適用できる。また、その際に使用する例えば緩衝剤、発色剤、蛍光物質、酵素、基質、放射性同位元素等の試薬類もこれら自体公知の免疫学的測定法に於いて用いられるものの中から適宜選択して用い  
5 れば足りる。

本発明の異常型 PrP の検出方法において用いられる抗体としては、異常型 PrP に結合し得る性質を有するものであれば、正常型 PrP とも反応性を有するものであっても良く、特に限定されない。

10 また、これらの抗体の由来については特に限定されないが例えば、ヒト、兎、馬、ウシ、羊、山羊、ラット、マウス等に由来する、上記した如き性質を有するものが挙げられる。

また、抗 PrP 抗体は、ポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でも何れにても良い。例えば、モノクローナル抗体は、市販品、或いは細胞融合技術や遺伝子組換え技術等を利用した自体公知の方法 [Eur.J  
15 immunol, 6, 511 (1976)] 等によって産生された、上記した如き性質を有するモノクローナル抗体は全て使用可能である。また、ポリクローナル抗体は、市販のものを使用しても良いし、また、動物抗血清から公知  
20 の方法（例えば、「タンパク質精製法, Robert.K.Scopes 著, シュプリンガー・フェアラーク東京株式会社, 1985 年, 37 頁～179 頁」等に記載された方法等。）で取得されるポリクローナル抗体を使用しても良い。これらを単独で或はこれらを適宜組み合わせ用いる等は任意である。

また、これら抗体は、要すればペプシン、パパイン等の酵素を用いて  
25 消化して F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、或は Fab として使用してもよいことは言うまでもない。

尚、均一の性質を有する抗体の特異性を考慮すると、ポリクローナル抗体よりもモノクローナル抗体の方が好ましい。

本発明に係る異常型 PrP の検出方法に於いて、抗 PeP 抗体を標識する  
5 ために用いられる標識物質としては、例えば E I A に於いて用いられる西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ等のペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、マイクロパーオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコース-6-リン酸脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素、ルシフェラーゼ等の酵素類、例え ば R I A で用いられる  $^{99m}\text{Tc}$ 、  
10  $^{131}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^3\text{H}$ 等の放射性同位元素、例えば F I A で用いられるフルオレセイン、ダンシル、フルオレスカミン、クマリン、ナフチルアミン或はこれらの誘導体等の蛍光物質、例えばルシフェリン、イソルミノール、ルミノール、ビス(2,4,6-トリフロロフェニル)オキザレート等の発光性物質、例え ばフェノール、ナフトール、アントラセン或はこれ  
15 らの誘導体等の紫外部に吸収を有する物質、例えば 4-アミノ-2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-1-オキシル、3-アミノ-2,2,5,5-テトラメチルピロリジン-1-オキシル、2,6-ジ-*t*-ブチル- $\alpha$ -(3,5-ジ-*t*-ブチル-4-オキソ-2,5-シクロヘキサジエン-1-イリデン)-*p*-トリルオキシル等のオキシル基を有する化合物に代表されるスピンラベル化剤としての性質を有する物質等  
20 が挙げられるが、これらに限定されるものではないことは言うまでもない。

中でもペルオキシダーゼ等の酵素類が、取扱いが簡便なため好ましい。

また、上記した如き標識物質を抗 PrP 抗体に結合させる（標識する）  
25 には、例えば自体公知の EIA、RIA あるいは FIA 等において一般に行われている自体公知の標識方法〔例えば、医化学実験講座、第 8 巻、山村

雄一監修、第1版、中山書店、1971；図説 蛍光抗体、川生明著、第1版、(株)ソフトサイエンス社、1983；酵素免疫測定法、石川榮治、河合忠、室井潔編、第2版、医学書院、1982等]を適宜利用して行えばよい。尚、当該標識物質を標識した抗 PrP 抗体は市販されているので、

5 それを用いても良い。

標識抗 PrP 抗体含有溶液を調製するための溶媒としては、標識抗 PrP 抗体が固相上に吸着或いは結合するのを妨げる性質を有するものでなければ良く、例えば精製水、例えばトリス緩衝液、リン酸緩衝液、ペロナール緩衝液、ホウ酸緩衝液、グッド緩衝液等通常抗原抗体反応を利用した測定法に用いられている緩衝液は全て挙げられる。緩衝液の pH としては抗原抗体反応を抑制しない範囲であれば特に限定されないが、通常

10 5~9 の範囲が好ましい。

また、これらの緩衝液中の緩衝剤濃度としては、通常 10~500mM、好ましくは 10~300mM の範囲から適宜選択される。また、この溶液中には、抗 PrP 抗体が固相上に吸着或は結合するのを妨げない量であれば、例えば糖類、NaCl 等の塩類、界面活性剤、防腐剤、蛋白質等が含まれていても良い。

15

抗原抗体反応の結果生成する抗原抗体複合物中の標識量を測定する方法としては、標識物質の種類により異なるが、標識物質が有している何らかの方法により検出し得る性質に応じて、それぞれ所定の方法に従い実施すればよい。例えば、標識物質が酵素の場合には EIA の常法、例えば「酵素免疫測定法」(蛋白質 核酸 酵素 別冊 No.31、北川常廣・南原利夫・辻章夫・石川榮治編集、51~63、共立出版(株)、1987)等に記載

20

25

された方法に準じて測定を行えばよく、標識物質が放射性物質の場合に

- は RIA の常法に従い、該放射性物質の出す放射線の種類および強さに応じて液浸型 GM カウンター、液体シンチレーションカウンター、井戸型シンチレーションカウンター、HPLC 用カウンター等の測定機器を適宜選択して使用し、測定を行えばよい（例えば医化学実験講座、第 5 8 巻、山村雄一監修、第 1 版、中山書店、1971 等）。また、標識物質が蛍光性物質の場合には蛍光光度計等の測定機器を用いる FIA の常法、例えば「図説 蛍光抗体、川生明著、第 1 版、(株)ソフトサイエンス社、1983」等に記載された方法に準じて測定を行えばよく、標識物質が発光性物質の場合にはフォトカウンター等の測定機器を用いる常法、例えば
- 10 「酵素免疫測定法」(蛋白質 核酸 酵素 別冊 No.31、北川常廣・南原利夫・辻章夫・石川榮治編集、252~263、共立出版(株)、1987)等に記載された方法に準じて測定を行えばよい。さらに、標識物質が紫外部に吸収を有する物質の場合には分光光度計等の測定機器を用いる常法によって測定を行えばよく、標識物質がスピンの性質を有する場合には電子
- 15 スピン共鳴装置を用いる常法、例えば「酵素免疫測定法」(蛋白質 核酸 酵素 別冊 No.31、北川常廣・南原利夫・辻章夫・石川榮治編集、264~271、共立出版(株)、1987)等に記載された方法に準じてそれぞれ測定を行えばよい。
- 20 より具体的には、例えば標識物質が酵素である場合は、これを酵素反応で発色を生じる基質等の発色試薬と反応させて発色反応に導き、その結果生成する色素量を分光光度計等により測定する方法等の自体公知の方法が挙げられる。

このような目的で用いられる発色試薬としては、例えばトリメチルベンジルピペラジン (TMB)、テトラメチルベンジジン、o-フェニレンジアミン、o-ニトロフェニル- $\beta$ -D-ガラクトシド、2, 2'-アジノ-ビス (3-

25



エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸) (ABTS)、N-エチル-N-スルホ  
プロピル-m-アニシジン (ADPS)、p-ニトロフェニルリン酸等、通常こ  
の分野で用いられる発色試薬が挙げられる。

- また、発色反応を停止させるには、例えば反応液に 1~6N の硫酸等の  
5 酵素活性阻害剤を添加する等、通常この分野で行われている反応停止方  
法を利用すればよい。

- 本発明の異常型 PrP の検出方法に於いて使用する標識抗体、発色試薬  
及びその他の試薬や、測定条件等 (反応温度、反応時間、測定波長、測  
10 定装置等) はすべて自体公知の上記した如き免疫学的測定法におけるそ  
れらに準じて選択すれば足り、自体公知の免疫学的測定法の測定操作法  
に準じて実施すれば良く、自動分析装置、分光光度計等も通常この分野  
で使用されているものは何れも例外なく使用し得る。

- 15 本発明の異常型 PrP の検出方法を、以下に具体的に説明する。

- 即ち、本発明に係る方法で得た異常型 PrP を固定化した固相に、例え  
ば POD 標識抗 PrP 抗体をアブライシ、10 分程度静置後、吸引濾過して、  
PrP に結合しなかった標識 PrP 抗体を除く。次いで洗浄剤をアブライシ、  
吸引する。この洗浄操作を数回行うことは任意である。次いで TMB を  
20 含有する発色液をアブライシ、30 分程度反応させる。反応後吸引濾過し  
て発色液を除去した後、停止液を添加して反応を停止させる。450nm に  
於ける吸光度をマイクロプレートリーダー等により測定する。

- 本発明に係る固定化方法を行えば、異常型 PrP を効率的に固相に固定化  
25 できるので、本発明に係るイムノブロットング方法によれば、ELISA 法  
やウェスタン・ブロット法等の従来の異常型 PrP 検出方法よりも、感度

よく異常型 PrP の検出及び分析を行うことができる。

本発明に係る異常型 PrP の検出方法に於いて異常型 PrP を検出し得る動物組織としては動物由来の延髄、小脳、脊髄その他の中枢神経系組織、リンパ節等の細網リンパ系組織、骨等が挙げられる。これらの由来動物としては、ヒト、ウシ、ヒツジ、ハムスター、マウス等が挙げられる。

本発明に係るプリオン病の判定方法としては、例えばカットオフ値を設定して行う方法がある。以下にその一例として BSE を判定する場合の例を示す。

すなわち、先ず PrP（正常型）を試料として用いて上記の PrP の検出方法を行い、標識抗 PrP 抗体の標識量(例えば吸光度。以下同じ)を測定し、この平均値と標準偏差 (SD) をだす。この平均値 + 2 SD をカットオフ値とする。

別に、同様の方法で BSE を判定すべき被検試料を用いて同様の方法で標識抗 PrP 抗体の標識量を測定し、検体値とする。

検体値がカットオフ値よりも低い場合には検体はプリオン病陰性と判定し、反対に検体値がカットオフ値と同じかそれよりも高い場合にはプリオン病陽性と判定するという方法である。

カットオフ値を得るために用いられる PrP は、動物組織から精製したもので、遺伝学的法で調製したリコンビナント PrP であってもよい。

本発明のプリオン病の判定方法によって判定し得るプリオン病としては、特に BSE が挙げられる。

本発明に係る蛋白質固定化用試液としては、本発明に係る低級アルコールと、ハロゲノカルボン酸及び／又は長鎖アルキル硫酸塩とを含有していればよく、その具体例は前記した通りである。

- 5     また、蛋白質固定化用試液中の低級アルコールの濃度は、蛋白質を固相に固定化する際に 30～50V/V%になるような濃度、ハロゲノカルボン酸の濃度は 0.1～10W/V%になるような濃度、長鎖アルキル硫酸塩の濃度は、0.1～1W/V%になるような濃度であればよい。より好ましくは、低級アルコールは 35～50V/V%、ハロゲノカルボン酸は 0.5～5W/V%、長鎖アルキル硫酸塩は 0.1～0.4W/V%、である。
- 10

更に、本発明に係る蛋白質固定化用試液には、蛋白質の固相への固定化、またそれに続く蛋白質の定量に影響を及ぼさないものであれば、その他に塩類、キレート等を含有していてもよい。

15

- 本発明に係る異常型 PrP 検出用キットとしては、(1)低級アルコールと、ハロゲノカルボン酸及び／又は長鎖アルキル硫酸とを含有する固定化用試液 1、(2)低級アルコール、ハロゲノカルボン酸及び界面活性剤を含有する固定化用試液 2、及び(3)異常型プリオン蛋白質と特異的に結合し得る標識抗体、を構成試薬として含有してなるものであり、その具体的な実施態様は前記した通りである。
- 20

- 尚、当該キットを構成する標識抗体が酵素標識抗体である場合には、更に当該酵素の反応により検出可能なシグナルを発生し得る当該酵素の基質を構成試薬として含有して成る。その好ましい態様及び具体例は前記した通りである。
- 25

以下に実施例を挙げて、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらにより何等限定されるものではない。

5

## 実施例

## 実施例 1.

## 【試料及び試液の調製】

## (1)蛋白質試料

卵白アルブミン（以下、OVA と略記する。ニワトリ卵白由来、和光純  
10 薬工業(株)製）、ヘモグロビン（ウシ血液由来、和光純薬工業(株)製）、IgG  
（ウシ由来、和光純薬工業(株)製）、チトクローム c（ウマ心筋由来、和  
光純薬工業(株)製）、リゾチーム（ニワトリ卵白由来、和光純薬工業(株)  
製）、を夫々秤量し、精製水に溶解して  $250 \mu\text{g}/\text{mL}$  溶液としたものを  
蛋白質試料として用いた。

## 15 (2)固定化用試液

各試薬を精製水に溶解して、下記の固定化用試液を調製した。この中  
で固定化用試液 3 ～ 5 が、本発明に係る固定化用試液である。

尚、各試薬は、エタノール（和光純薬工業(株)製、特級）、トリクロロ  
酢酸（以下、TCA と略記する。和光純薬工業(株)製、化学用）、ドデシル  
20 硫酸ナトリウム（以下 SDS と略記する。和光純薬工業(株)製、化学用）  
を用いた。

対照                   : 精製水

固定化用試液 1 : 0.2 W/V % SDS、

固定化用試液 2 : 0.2 W/V % SDS、2.5W/V% TCA

25 固定化用試液 3 : 0.2 W/V % SDS、45V/V% エタノール

固定化用試液 4 : 0.2 W/V % SDS、2.5W/V% TCA、45V/V% エタノ

ール

固定化用試液 5 : 2.5W/V% TCA、45V/V% エタノール

(3)固定化用試料

5 蛋白質試料 20  $\mu$ L (蛋白質 5  $\mu$ g) と、所定の固定化用試液 300  $\mu$ L とを混合したものを調製し、固定化用試料とした。固定化用試料中の各試薬の終濃度 (PVDF 膜と接触させる際の濃度。以下同じ。) は、夫々下記の通りである。

固定化用試料 1 : 0.19 W/V % SDS、

固定化用試料 2 : 0.19 W/V % SDS、2.34W/V% TCA

10 固定化用試料 3 : 0.19 W/V%SDS、42.2V/V%エタノール

固定化用試料 4 : 0.19 W/V % SDS、2.34W/V% TCA、42.2V/V% エタノール

固定化用試料 5 : 2.34W/V% TCA、42.2V/V% エタノール

15 [蛋白質の固定化及び測定]

ドットプロッター ADVANTEC DP-96 (アドバンテック製) に親水化処理したポリビニリデンジフロライド膜 (PVDF 膜、ミリポア製、イモビロン PS9 0.1  $\mu$ m) をセットした。次に PVDF 膜に固定化用試料 320  $\mu$ L をアブライシ、真空ポンプ (バイオクラフト社製) にて、15KPa  
20 (10cmHg) で 10 分間吸引濾過した。次いで pH7.4 リン酸緩衝食塩水 (PBS) 300  $\mu$ L をアブライシ、同様に吸引濾過して、PVDF 膜を洗浄した。PVDF 膜を取り出し真空乾燥させた後、Pyromolex 試液 (Protein Assay Rapid Kit wako、和光純薬工業(株)製) で発色させ、次いでデンシトメーター SHIMADZU CS-9000 ((株)島津製作所 製) で 600nm の  
25 吸光度 (シグナル強度) を測定した。

## 【結果】

結果を図 1 に示す。図 1 に於いて、各バーは下記固定化用試料を用いた場合の結果を夫々示す。







	精製水
	固定化用試料 1
	固定化用試料 2
	固定化用試料 3
	固定化用試料 4
	固定化用試料 5

図 1 から明らかなように、試薬として SDS のみを含有する固定化用試料 1 を膜に固定化させた場合は、シグナル強度が全く測定できなかった（固定化用試料 1）。また、SDS と TCA を含有する固定化用試料 2 を用いた場合は、少しシグナル強度が強くなった（測定できた）が、対照（精製水を用いた場合、従来の固定化法）ほど高いシグナル強度は得られなかった。

これに対し、SDS とエタノールを含有する固定化用試料 3 を用いた場合は、対照と同等若しくはそれ以上のシグナル強度が得られた。

また、TCA とエタノールを含有する固定化用試料 5 を用いた場合は、チトクローム c を固定化した場合以外は、すべて対照と比較して遙かに高いシグナル強度が得られた。

更に、TCA とエタノールと SDS を含有する固定化用試料 4 を用いた場合には、チトクローム c を固定化した場合も含めて、全ての場合で対照と比較して遙かに高いシグナル強度が得られた。

以上のことより、低級アルコールとハロゲンカルボン酸及び／又は長鎖アルキル硫酸塩の共存下で行う本発明に係る固定化法によれば、従来の水や緩衝液だけを用いて行っていた固定化法と比較して、膜への蛋白

質の固定化率を飛躍的に向上させることができることが判る。

また、固定化用試料 3 及び 4 で、対照と同程度又はそれより高いシグナル強度が測定できたことから、本発明の固定化法によれば、予め SDS 等を含有する試料を用いても、蛋白質を固定化することができることが判る。

#### 実施例 2.

##### 【試料及び試液の調製】

##### 10 (1)蛋白質試料

リゾチーム、チトクローム c、IgG、フィブリノーゲン(ヒト血漿由来、和光純薬工業(株)製)、BSA (牛血清アルブミン、和光純薬工業(株)製)、OVA、トリプシンインヒビター (大豆由来、和光純薬工業(株)製)、ヘモグロビンを夫々秤量し、精製水に溶解して 250  $\mu$ g/mL 溶液としたものを蛋白質試料として用いた。

尚、これらの蛋白質は等電点 pI が 4.0-11.4 の幅広い範囲にあり、分子量は 12000-150,000 と広範囲のものである (久保ら,蛋白質 生化学ハンドブック,丸善株式会社,54-73 (1984)参照)。

##### (2)固定化用試液

20 2.5 W/V% TCA、45 V/V% エタノール、及び所定濃度 (0~0.4W/V%) の SDS を含有するように、精製水に溶解して調製したものを固定化用試液として用いた。

##### (3)固定化用試料

所定の蛋白質試料 20  $\mu$ L (蛋白質量 5  $\mu$ g) と固定化用試液 300  $\mu$ L とを混合したものを調製し、固定化用試料とした (TCA 終濃度 2.34W/V%、エタノール終濃度 42.2V/V%)。

### [蛋白質の固定化及び測定]

実施例 1 と同様の方法で、各固定化用試料中の蛋白質を PVDF 膜に固定化し、洗浄、染色処理し、次いでデンシトメーターで 600nm の吸光度（シグナル強度）を測定した。

### [結果]

結果を図 2 に示す。

図 2 に於いて、 $\Delta$  はリゾチーム、 $---$  はチトクローム c、 $\bigcirc$  は IgG、 $\square$  はフィブリノーゲン、 $\bullet$  は BSA、 $\blacklozenge$  は OVA、 $\diamond$  はトリプシンインヒビターを含有する蛋白質試料を用いた場合の結果を夫々示す。また、横軸は固定化用試液中の SDS 濃度を示す。更に、図 2 中の、各ポイントのバーは、 $\pm$ SD を示す。

図 2 から明らかな如く、殆どの蛋白質で SDS 共存下に PVDF 膜に固定化させると、一旦シグナル強度が増加するが、SDS 濃度が 0.1W/V% 以上になるとシグナル強度がある一定の値を示す傾向を示した。このことから、固定化用試液中の SDS 濃度を 0.1W/V% 以上（固定化用試料中の終濃度 0.09W/V% 以上）とすることにより、試料中の蛋白質の PVDF 膜への固定化率が一定となると考えられる。

また、データのバラツキを示す CV 値（CV 値＝標準偏差／平均値（%））についてみると、どの蛋白質も固定化用試液中の SDS 濃度が 0.1 W/V% より低い濃度では、CV 値が大きく、シグナル強度が安定していないことが分かる。それに対し、固定化用試液中の SDS 濃度が 0.1W/V% 以上の場合、CV 値が比較的小さく、上述したようにこの濃度範囲でシグナル強度の値が安定であることが示されている。この結果は、試料中の蛋白質の固相膜に固定化される量を示していると考えられる。また、デ



一夕は示していないが、この結果は再現性があることを確認している。

一般に、SDS 等の長鎖アルキル硫酸塩は、0.0025 W/V%といったかなりの低濃度でも蛋白質の構造崩壊作用を示し、構造崩壊の程度により蛋白質結合（染色）色素に対する反応性に違いを生ずるといわれている（Orsonneau, J-L et al., Clin.Chem., 35, 2233-2236 (1989)）。従って、ここでも、それが要因となって、SDS 濃度が 0.1 W/V%より低い固定化溶液を用いた場合で、シグナル強度が上昇する等の急激な変化を示し、且つ、それが変化の途中過程にあるため、CV 値（<15%）が大きくなったと推察される。また、このことは、0.1 W/V%より低い SDS 濃度条件下では、試料中の蛋白質の PVDF 膜への固定化率が変動している（一定でない）可能性をも示唆している。

以上のことより、図 2 に於いて、SDS の濃度変化の影響を受けずに吸光度（シグナル強度）が安定した時、始めて蛋白質の PVDF 膜への固定化率が一定になっているのではないかと推察された。

そこで、図 2 の結果を基に、蛋白質試料として BSA を用い、0.1 W/V% SDS を含有する固定化用試液で固定化した後測定を行った場合のシグナル強度を 100（基準値）とした。そして、基準値に対する、その他の各蛋白質を蛋白質試料として用い、0.1W/V%SDS、0.2 W/V%SDS、0.3 W/V%SDS 又は 0.4 W/V%の SDS 固定化用試液を用いて同様に固定化及び測定を行って得られたシグナル強度の相対値を夫々算出した。

表 1 に、SDS 濃度が 0.2W/V%~0.4W/V%まで変化するまで、表 2 には SDS 濃度が 0.1W/V%~0.4W/V%まで変化するまでの、各ポイントの CV 値を平均化した値（平均 CV 値（%））、各ポイントの相対値の平均値、そのポイント間の絶対偏差を平均した値（平均絶対偏差）、平均絶対偏差

をその平均値で割りパーセント表示した値（ポイント間変動率（％））を夫々示す。ポイント間変動率とは、SDS 濃度変化に伴うシグナル強度の変化を変動率として算出した値のことで、この数字が小さいほど、SDS 濃度に影響されずにシグナル強度（測定結果）が一定であることを示している。

表 1

蛋白質	平均 CV 値(%)	平均値	平均絶対偏差	ポイント間変動率(%)
BSA	4.9	85.6	7.0	10.7
トリプシンインヒビター	2.6	53.1	4.0	7.5
フィブリンノーゲン	1.8	58.5	0.8	1.4
OVA	1.5	68.3	1.4	2.0
ヘモグロビン	1.7	71.9	4.6	6.4
IgG	0.8	98.5	1.9	1.9
チトクローム c	1.9	127.1	3.5	2.7
リゾチーム	1.8	87.4	6.4	7.4
CV 値の平均 2.1				ポイント間変動率の平均 5.0

10

表 2

蛋白質	平均 CV 値(%)	平均値	平均絶対偏差	ポイント間変動率(%)
BSA	3.9	74.2	13.87	18.7
トリプシンインヒビター	2.5	54.4	4.62	8.5
フィブリンノーゲン	1.5	62.7	6.38	10.2
OVA	1.3	69.6	2.32	3.3
ヘモグロビン	1.7	68.6	5.94	8.7
IgG	0.8	98.3	3.17	3.2
チトクローム c	2.1	127.4	2.93	2.3
リゾチーム	1.8	92.0	9.48	10.3
CV 値の平均 2.0				ポイント間変動率の平均 8.1

その結果、表 1 より、SDS 濃度が 0.2 W/V%–0.4W/V%間で、例えば  
フィブリノーゲン、OVA、IgG、チトクローム c は、そのポイント間変  
動率が最も安定し、1.4–2.7%を示した。また、これら蛋白質の平均 CV  
5 値 (0.8–1.9%) と比較しても遜色ない結果であり、SDS 濃度が変化し  
てもシグナル強度の変動が非常に少ないことを示している。

また、表 2 より、フィブリノーゲンを除く 3 つの蛋白質は、SDS 濃度  
が 0.1–0.4 W/V%の間でもポイント間変動率が 2.3–3.3%であり、SDS  
濃度の影響によるシグナル強度の変動が少ないことがわかる。

- 10 また、SDS 濃度が 0.1–0.4 W/V%の間でポイント間変動率が 10%を超  
えるフィブリノーゲン、リゾチーム、BSA についても、SDS 濃度を 0.2  
–0.4W/V%に限定すると安定した結果が得られることが判る。

以上のことより、SDS 濃度が 0.1W/V%以上でポイント間変動率が安  
定してくることから、この濃度範囲の SDS を含有する固定化用試液を用  
15 いて、蛋白質を固定化すると、試料中の蛋白質量の正確な定量が行える  
ことが判る。

### 実施例 3. 低級アルコールの検討

低級アルコールとしてエタノールの代わりにメタノールを用いた場合  
20 の蛋白質試料の固定化及び測定を行った。

#### [試料及び試液の調製]

##### (1)蛋白質試料

BSA、OVA、ヘモグロビン、IgG、チトクローム c、リゾチームを夫々  
秤量し、精製水に溶解して 250  $\mu$ g/mL 溶液としたものを蛋白質試料と  
25 して用いた。

##### (2)固定化用試液

精製水を用いて下記固定化用試液を調製した。

固定化用試液 1 : 0.2 W/V% SDS、2.5 W/V% TCA

固定化用試液 2 : 0.2 W/V% SDS、2.5 W/V% TCA、45% エタノール

固定化用試液 3 : 0.2 W/V% SDS、2.5 W/V% TCA、45% メタノール

5 (和光純薬工業(株)製、特級)

### (3)固定化用試料

蛋白質試料 20  $\mu$ L (蛋白質量 5  $\mu$ g) と、所定の固定化用試液 300mL  
とを混合したものを調製し、固定化用試料 1, 2, 3 とした。固定化用試  
料中の各試薬の終濃度は、夫々 SDS 0.19W/V%、TCA 2.34W/V%、エタ  
10 ノール 42.2V/V%、メタノール 42.2V/V%である。

### [蛋白質の固定化及び測定]

実施例 1 と同様の方法で、各固定化用試料中の蛋白質を PVDF 膜に固  
定化し、洗浄、染色処理し、次いでデンストメーターで 600nm の吸光  
15 度 (シグナル強度) を測定した。

### [結果]

結果を図 3 に示す。図 3 に於いて、各バーは夫々下記固定化用試料を

	固定化用試料 1
	固定化用試料 2 20
	固定化用試料 3

用いた場合の結果を示す。

図 3 から明らかな如く、メタノールを含有する固定化用試液を用いて  
調製した固定化用試料を用いた場合も、エタノールを用いた場合と同程  
25 度のシグナル強度が得られ、蛋白質を PVDF 膜に固定化することができ  
たことが判る。

#### 実施例 4. ハロゲンカルボン酸の検討

ハロゲンカルボン酸として、TCA の代わりにトリフルオロ酢酸（以下、TFA と略記する。）を用いた場合の蛋白質試料の固定化及び測定を行った。

##### [試料及び試液の調製]

##### (1)蛋白質試料

BSA、IgG、リゾチームを夫々秤量し、精製水に溶解して  $250 \mu\text{g}/\text{mL}$  溶液としたものを蛋白質試料として用いた。

##### 10 (2)固定化用試液

精製水を用いて、下記固定化用試液を調製した。

固定化用試液 1: 0.2 W/V% SDS、45 V/V% エタノール

固定化用試液 2: 0.2 W/V% SDS、45 V/V% エタノール、2.5 W/V% TCA

15 固定化用試液 3: 0.2 W/V% SDS、45 V/V% エタノール、2.5 W/V% TFA  
(和光純薬工業(株)製)

##### (3)固定化用試料

蛋白質試料  $20 \mu\text{L}$  (蛋白質量  $5 \mu\text{g}$ ) と、所定の固定化用試液  $300 \text{mL}$  とを混合したものを調製し、固定化用試料 1, 2, 3 とした。固定化用試料中の各試薬の終濃度は、夫々 SDS 0.19W/V%、TCA 2.34W/V%、TFA 2.34W/V%、エタノール 42.2V/V% である。

##### [蛋白質の固定化および測定]

実施例 1 と同様の方法で、各固定化用試料中の蛋白質を PVDF 膜に固定化し、洗浄、染色処理し、次いでデンスitomーターで 600nm の吸光度 (シグナル強度) を測定した。

# [結果]

結果を図4に示す。図4に於いて、各バーは夫々下記固定化用試料を用いた場合の結果を示す。

5

	固定化用試料 1
	固定化用試料 2
	固定化用試料 3

図4から明らかな如く、TFAを含有する固定化用試液を用いて調製した固定化用試料を用いた場合も、TCAを用いた場合と同程度又はそれ以上のシグナル強度が得られ、蛋白質を有効に膜に固定化することができたことが判る。

10

## 実施例5. 検量線の作成

### [試料及び試液の調製]

#### (1)蛋白質試料

OVAを0~20 $\mu$ g/20 $\mu$ Lとなるように精製水に溶解して蛋白質試料とした。

15

#### (2)固定化用試液

0.2 V/V% SDS、2.5 V/V% TCA、45 V/V% エタノールとなるように精製水に溶解して調製したものを固定化用試液として用いた。

#### (3)固定化用試料

20 蛋白質試料20 $\mu$ L(蛋白質量5 $\mu$ g)と、固定化用試液300 $\mu$ Lとを混合したものを調製し、固定化用試料とした。固定化用試料中の各試薬の終濃度は、夫々SDS 0.19W/V%、TCA 2.34W/V%、エタノール 42.2V/V%である。

### 【蛋白質の固定化及び測定】

実施例 1 と同様の方法で、各固定化用試料中の蛋白質を PVDF 膜に固定化し、洗浄、染色処理し、次いでデンシトメーターで 600nm の吸光度（シグナル強度）を測定した。

5

### 【結果】

その結果を基に、蛋白質量（ $\mu\text{g}$ ）とシグナル強度との関係を示す検量線を作成した。

結果を図 5 に示す。図 5 に於いて、各プロットのバーは、 $\pm 2\text{SD}$  を示す。

検量線から得られた結果は、測定範囲  $0.2\text{--}20\mu\text{g}$ /蛋白質試料、一致係数 0.99 以上、平均 CV1.9% であった。

また、蛋白質濃度  $0.2\text{--}5\mu\text{g}$ /蛋白質試料の範囲で、直線性が得られた。測定結果を統計処理して得られた、この範囲での回帰直線式及び相

15 関係数は下記の通りである。

回帰直線式： $y=0.12x+0.01$

相関係数（ $R^2$ ）：0.99

x：蛋白質量

y：シグナル強度

図 5 から明らかな如く、本発明の方法により OVA を PVDF 膜に固定化し、蛋白質量の測定を行ったところ、良好な直線性を示す検量線が得られるので、本発明の固定化方法によれば、高精度の OVA（蛋白質）濃度の定量測定が行えることが判った。

尚、データは示していないが、実施例 2 で測定した他の蛋白質についても同様に測定を行った結果、OVA と同様に直線性のある検量線が得られ、これらの蛋白質についても定量測定が行えることが判った。

25

## 実施例 6.

### [試料及び試液の調製]

#### (1)蛋白質試料

- 5 精製水を用いて、BSA、トリプシンインヒビター、フィブリノーゲン、OVA、ヘモグロビン、IgG、チトクローム c、リゾチーム夫々の  $5\mu\text{g}/20\mu\text{L}$  溶液を調製し、蛋白質試料とした。

#### [固相化法による蛋白質の測定]

- 10 精製水を用いて  $0.2\text{W}/\text{V}\%$  SDS、 $2.5\text{W}/\text{V}\%$  TCA、 $45\text{V}/\text{V}\%$  エタノールを含有する固定化用試液を調製した。次いで、調製した蛋白質試料  $20\mu\text{L}$  と固定化用試液  $300\mu\text{L}$  を混合し、得られた固定化用試料  $320\mu\text{L}$  を用いて実施例 1 と同様の方法で固定化用試料中の蛋白質を PVDF 膜に固定化、洗浄、染色処理し、次いで、デンストメーターで  $600\text{nm}$  の吸光度（シグナル強度）を測定した。固定化用試料中の各試薬の終濃度は、夫々 SDS  $0.19\text{W}/\text{V}\%$ 、TCA  $2.34\text{W}/\text{V}\%$ 、エタノール  $42.2\text{V}/\text{V}\%$  である。
- 15

#### [液相法による蛋白質の測定]

- 上記で調製した蛋白質試料  $20\mu\text{L}$  に、 $1\text{mL}$  Pyromolex 液を添加して、  
20 室温で 20 分間インキュベーションし、 $600\text{nm}$  の吸光度を測定した。

#### [結果]

- 蛋白質試料として BSA を用い、 $0.2\text{W}/\text{V}\%$  SDS を含有する固定化用試料を調製して、BSA を固定化、測定を行った場合の吸光度（シグナル強度）を 1（基準値）とした時の、基準値に対する各蛋白質について同様  
25 に固定化、測定を行って得られた吸光度の相対値を求めた結果を図 6 に



示す。また、同様に蛋白質試料として BSA を使い、液相法による測定を行った場合の吸光度を 1（基準値）とした時の、基準値に対する各蛋白質について同様に液相法による測定を行って得られた吸光度の相対値を求めた結果も、図 6 に併せて示す。

- 5     尚、図 6 に於いて、各バーは夫々下記の方法により各蛋白質を測定した結果に基づいて得られた、上記相対値を示す。

	固相法
	液相法

- 図 6 より明らかな如く、液相法による測定では、蛋白質濃度は同じでも、蛋白質の種類によって、BSA に対する吸光度の相対値が大きく異なり、例えばフィブリノーゲンでは、0.46 程度であった。

これに対し、本発明の固相法によって測定を行った場合の BSA に対するフィブリノーゲンの吸光度(シグナル強度)の相対値は 0.75 になり、BSA の場合との吸光度の差が少なくなっていることが判る。これは、測定した殆どの蛋白質についても言える。

- 15     また、測定した全蛋白質の平均吸光度の、BSA の場合のそれを 1 とした場合に対する相対値は、液相法の場合は 0.65 であるのに対して本発明の固相法の場合は 0.94 となり、蛋白質種による定量誤差が改善されたことが判る。これはタンパク質が変性状態で膜にトラップされることにより、液相法では反応できなかった、例えばチトクローム c、リゾチーム  
20     等の塩基性アミノ酸が、染色液と結合できる状態となり、本発明に係る固定化液で蛋白質が効率良く固定化され、より正確な測定結果を得られるようになったと考えられる。

実施例 7.

## [試料の調製と固定化]

精製水を用いて、IgG 試料（蛋白質量  $0 \sim 4 \mu\text{g}/20 \mu\text{L}$ ）、及び 2%SDS 含有 IgG 試料（蛋白質量  $0 \sim 4 \mu\text{g}/20 \mu\text{L}$ ）を調製した。別に精製水を用いて 0.25W/V%SDS、2.5W/V%TCA 及び 45V/V%エタノールを含有する固定化用試液を調製した。次いで、蛋白質試料  $20 \mu\text{L}$  と固定化用試液  $300 \mu\text{L}$  を混合し、得られた固定化用試料  $320 \mu\text{L}$  を用いて実施例 1 と同様の方法で固定化用試料中の蛋白質を PVDF 膜に固定化、洗浄、染色処理し、次いでデンストメーターで 600nm の吸光度（シグナル強度）を測定した。

- 10 尚、SDS を含有しない IgG 試料を用いて得られた固定化用試料中の各試薬の終濃度は、夫々 SDS 0.23W/V%、TCA 2.34 W/V%、エタノール 42.2V/V%である。また、2%SDS 含有 IgG 試料を用いて得られた固定化用試料中の各試薬の終濃度は、夫々 SDS 0.36 W/V%、TCA 2.34 W/V%、エタノール 42.2 V/V%である。

15

## [結果]

得られた結果を基に、SDS を含有しない IgG 試料を用いた場合と、2%SDS 含有 IgG 試料を用いた場合夫々について、蛋白質量（ $\mu\text{g}$ ）とシグナル強度との関係を示す検量線を作成した。

- 20 結果を図 7 に示す。図 7 に於いて、—◆—は SDS を含有しない IgG 試料を用いた場合、—△—は SDS を含有する IgG 試料を用いた場合の結果を夫々示す。また、各プロットのバーは、 $\pm\text{SD}$  を示す。

図 7 より明らかな如く、両方の検量線は、ほぼ一致した。

- 25 この結果から、本発明の固定化方法により蛋白質を固定化させれば、SDS が蛋白質試料中に存在していても、それに影響されることなく、目的の蛋白質を固相に固定化させ、蛋白質の定量を行うことができること

が判る。

#### 実施例 8.

- 5 SDS を含有する種々の蛋白質試料を用いて本発明に係る蛋白質の固定化及び測定を行い、当該測定に及ぼす SDS の影響を、液相法による測定の場合と比較した。

#### [試料及び試液の調製]

##### (1)蛋白質試料

- 10 精製水を用いて、0W/V%SDS (対照)、0.2W/V%SDS 又は 2W/V%SDS を含有する蛋白質試料 (BSA、トリプシンインヒビター、フィブリノーゲン、ヘモグロビン、OVA、チトクローム c、リゾチーム、IgG、トリプシン (和光純薬工業(株)製) 夫々 250  $\mu$ g/mL を調製した。

#### [固定化法による蛋白質の測定]

- 15 精製水を用いて 0.1W/V%SDS、2.5W/V%TCA、45V/V%エタノールを含有する固定化用試液を調製した。次いで調製した蛋白質試料 20  $\mu$ L と固定化用試液 300  $\mu$ L を混合し、得られた固定化用試料 320  $\mu$ L を実施例 1 と同様の方法で固定化、洗浄、染色処理し、デンストメーターで、600nm の吸光度 (シグナル強度) を測定した。

20

#### [液相法による測定]

上記で調製した蛋白質試料 20  $\mu$ L に、1mL Pyromolex 液 (Protein Assay Rapid Kit wako、和光純薬工業(株)製) を添加して、20 分室温でインキュベーションし、600nm に於ける吸光度を測定した。

25

#### [結果]

得られた結果を、夫々の対照（SDS 含有していない試料）を用いて得られた結果を 100 とした相対値で表し、表 3 にまとめた。

表 3

	固相法			液相法		
	対照	0.2W/V% SDS 含有	2W/V% SDS 含有	対照	0.2W/V% SDS 含有	2W/V% SDS 含有
BSA	100	95	83	100	0	0
トリプシンインヒター	100	108	101	100	0	0
フィブリンノーゲン	100	107	91	100	35	0
ヘモグロビン	100	119	104	100	0	0
OVA	100	105	104	100	2	0
チトクローム c	100	120	128	100	2	0
リゾチーム	100	111	97	100	3	0
IgG	100	107	104	100	34	0
トリプシン	100	87	103	100	0	0

5

表 3 から明らかな如く、本発明に係る固相法による蛋白質の測定を行った場合には、2W/V%SDS 含有試料でも殆どの蛋白質で、対照に対し±20%以内の測定結果が得られ、蛋白質試料中の SDS が蛋白質測定に及ぼす影響を回避できたことが判る。

10

これに対して、2W/V%SDS 含有試料を用いて液相法によって測定を行った場合には、全く測定ができなかった。

以上の結果から、本発明の蛋白質の固定化法及び定量方法は、あらゆる蛋白質に適用することができることが判る。また、これまで知られて

いたタンパク定量阻害剤、特に蛋白質可溶化剤として汎用される SDS 含有試料中の蛋白質定量が可能になった点で、非常に有用でもあることが明らかとなった。

15

## 実施例 9.

試料中に含まれる界面活性剤が、本発明の固定化用試液を用いた固定化方法及び蛋白質の測定に及ぼす影響を調べた。

[固相法による固定化及び蛋白質の測定]

## 5 (1) BSA 又は IgG 含有蛋白質試料中の蛋白質の測定

精製水で、表 4 記載の濃度となるように、各界面活性剤を含有する BSA 試料又は IgG 試料 (蛋白質量  $4\mu\text{g}/20\mu\text{L}$ ) を調製し、蛋白質試料とした。

別に、精製水で 0.1W/V%SDS、2.5 W/V% TCA、45 V/V% エタノールを含有する固定化用試液を調製した。

次いで蛋白質試料  $20\mu\text{L}$  と固定化用試液  $300\mu\text{L}$  を混合して固定化用試料を調製し、その  $320\mu\text{L}$  を用いて、実施例 1 と同様の方法で固定化用試料中の蛋白質を PVDF 膜に固定化、洗浄、染色処理し、600nm の吸光度 (シグナル強度) を測定した。

15 固定化用試料中の各試薬の終濃度は、SDS を含有しない蛋白質試料を用いた場合は、SDS 0.094W/V%、TCA 23.4W/V%、エタノール 42.2V/V% である。また、SDS 含有蛋白質試料を用いた場合の各試薬の終濃度は、TCA 及びエタノールの終濃度は SDS を含有しない蛋白質試料を用いた場合と同じであるが、SDS の終濃度は、1 % SDS 含有蛋白質試料を用いた場合は 0.16W/V%、2 % SDS 含有試料を用いた場合は 0.21W/V%、  
20 4 % SDS 含有試料を用いた場合は、0.34W/V%となる。

## (2) OVA 含有蛋白質試料中の蛋白質の測定

表 4 記載の濃度となるように、各界面活性剤を含有する OVA 試料 (蛋白質量  $5\mu\text{g}/20\mu\text{L}$ ) を調製し、蛋白質試料とした。

別に、精製水で 0.2W/V%SDS、2.5 W/V% TCA、45 V/V% エタノール

ルを含有する固定化用試液を調製し、上記（１）と同様の方法で固定化用試料を調製し、実施例１と同様の方法で PVDF 膜に固定化、洗浄、染色処理し、600nm の吸光度（シグナル強度）を測定した。

尚、固定化用試料中の各試薬の終濃度は、SDS を含有しない蛋白質試料を用いた場合は、SDS 0.19W/V%、TCA 23.4W/V%、エタノール 42.2V/V%である。また、2% SDS 含有蛋白質試料を用いた場合の各試薬の終濃度は、SDS 0.31W/V%、TCA 23.4%、エタノール 42.2W/V%となる。

また、界面活性剤（阻害物質）を含有しない以外は上記と同様に調製した BSA 試料、IgG 試料、OVA 試料を用いて同様に固定化、測定を行い、対照とした。

#### [液相法による蛋白質の測定]

表４記載の濃度となるように各界面活性剤を含有する BSA 試料（10  $\mu\text{g}/20\mu\text{L}$ ）を調製したものを扱い、1mL Pyromolex 溶液を使って、実施例６と同様の方法で測定した。

また、界面活性剤（阻害物質）を含有しない以外は上記と同様に調製した BSA 試料を用いて同様に液相法による測定を行い、対照とした。

#### 20 [結果]

夫々の測定は３回ずつ行い、得られた吸光度の平均値を求めた。対照を用いて得られた平均値を 100 として、それに対する界面活性剤を含有する試料を用いて得られた吸光度の平均値の相対値（%）を求め、その相関変位（CV）と併せて表４に示す。

25 表４に於いて、界面活性剤（阻害物質）の濃度は、蛋白質試料中の濃度を示す。また、液相法のデータ中、左側の値は界面活性剤の濃度を、

右側の値は対照に対する、界面活性剤を含有する試料を用いた場合の平均測定値の相対値(%) $\pm$ CVを示す。

尚、表4に示したデータは、界面活性剤の最大許容濃度時のデータ、すなわち、添加剤として界面活性剤を用いた場合に、対照(添加剤なし)と比較して平均値が $\pm 20\%$ となる結果が得られた時のデータを示している。

表 4

界面活性剤	濃度	固相化法		液相法	
		BSA(4 $\mu$ g)	IgG(4 $\mu$ g)	OVA(5 $\mu$ g)	BSA(10 $\mu$ g)
		mean(%) $\pm$ CV	mean(%) $\pm$ CV	mean(%) $\pm$ CV	mean(%) $\pm$ CV
SDS	1% (w/v)	87 $\pm$ 7.1			(0.01%(w/v), 92 $\pm$ 6.0)
	2% (w/v)	82 $\pm$ 6.2	100 $\pm$ 0.9	117 $\pm$ 2.2	
	4% (w/v)		103 $\pm$ 4.3		
SLS	2% (w/v)		101 $\pm$ 1.9		(0.1%(w/v), 109 $\pm$ 7.3)
	3% (w/v)	94 $\pm$ 3.7			
Triton X-100	1% (w/v)		112 $\pm$ 0.2		(0.1%(w/v), 107 $\pm$ 3.9)
	2% (w/v)	98 $\pm$ 1.9	115 $\pm$ 1.5	113 $\pm$ 3.0	
NP-40	1% (w/v)	96 $\pm$ 4.5	115 $\pm$ 3.0		(0.1%(w/v), 116 $\pm$ 4.7)
	2% (w/v)	90 $\pm$ 1.2		115 $\pm$ 2.4	
Tween 20	0.05% (w/v)		110 $\pm$ 4.4		
	0.1% (w/v)	97 $\pm$ 4.5	116 $\pm$ 2.8		115 $\pm$ 1.0
	0.2% (w/v)	89 $\pm$ 2.6		109 $\pm$ 1.6	
Tween 80	0.05% (w/v)	105 $\pm$ 2.7			
	0.1% (w/v)	82 $\pm$ 2.0	112 $\pm$ 0.6	111 $\pm$ 0.7	112 $\pm$ 1.4
Brij 35	1% (w/v)		107 $\pm$ 3.4		(0.1%(w/v), 108 $\pm$ 3.2)
	2% (w/v)	93 $\pm$ 3.9		112 $\pm$ 2.8	
CHAPS	1% (w/v)	96 $\pm$ 2.6	111 $\pm$ 2.2		(0.1%(w/v), 104 $\pm$ 0.0)
	2% (w/v)	91 $\pm$ 1.8	116 $\pm$ 1.3	106 $\pm$ 0.9	
CTAB	0.05% (w/v)			112 $\pm$ 0.2	
	0.1% (w/v)			123 $\pm$ 1.0	

10 SLS : N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム

Triton X-100 (ローム アントハース社商品名) :  $\alpha$ -リオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテル

NP-40 (日本エマルジョン(株)商品名) :  $\alpha$ -リオキシエチレン(9)オクチルフェニルエーテル

Tween 20 (花王(株)商品名) :  $\alpha$ -リオキシエチレンソルビタンモノラウレート

Tween 80 (花王(株)商品名) :  $\alpha$ -リオキシエチレンソルビタンモノオレレート

15 Brij 35 (ICI 社商品名) :  $\alpha$ -リオキシエチレンラウリルエーテル

CHAPS : 3-[(3-コラミド・フ・ロビ・ル)シ・メチルアンモニウム・ロハ・ンスルホン酸]

CTAB : セチルトリメチルアンモニウム・ロマイド

表4から明らかな如く、本発明の方法により蛋白質を固定化し測定した場合、蛋白質試料の調製時に一般に用いられる界面活性剤が高濃度共存していても、それに影響を受けずに蛋白質の測定が可能であることが判る。特に液相法と比較すると、液相法の10倍又はそれ以上の濃度の界面活性剤が蛋白質試料中に添加剤として共存していても、測定可能であることが判る。

10 以上のことより、本発明の蛋白質の固定化方法は、従来より添加剤として汎用されている界面活性剤に起因する問題、即ち蛋白質の定量を阻害するという問題を解決し得るものであることが判る。

#### 実施例10. イムノブロッティング

##### 15 [試料及び試液の調製]

##### (1)蛋白質試料

マウスIgG(和光純薬工業(株)製)を秤量し、精製水に溶解して0~200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  溶液としたものを蛋白質試料として用いた。

##### (2)固定化用試液

20 精製水で、0.2 W/V% SDS、2.5 W/V% TCA、45 V/V% エタノールを含有する固定化用試液を調製した。

##### (3)固定化用試料

上記で調製した各濃度の蛋白質試料夫々20  $\mu\text{L}$  と、固定化用試液 300  $\mu\text{L}$  を混合したもの(SDS 終濃度 0.19W/V%、TCA 終濃度 2.34W/V%、  
25 エタノール終濃度 42.2V/V%)を調製し、固定化用試料とした。

##### (4)ブロッキング溶液



ブロッケーース（雪印乳業(株)製）を終濃度 25%となるように PBS (pH7.4) で希釈したものを用いた。

(5)抗体溶液

発光検出用抗体溶液：西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG

- 5 抗体（アマシャムバイオサイエンス製）をブロッキング溶液で 1/10000 希釈したものを用いた。

発色検出用抗体溶液：アルカリフォスファターゼ標識抗マウス IgG 抗体（和光純薬工業(株)製）をブロッキング溶液で 1/1000 希釈したものを用いた。

10 (6)洗浄液

Tween 20 を、終濃度 0.05%となるように PBS (pH7.4) で希釈したものを用いた。

(7)検出試薬

- 15 発光検出用：ECL Plus Western Blotting Starter Kit (アマシャムバイオサイエンス(株)製)

発色検出用：0.033% ニトロブルーテトラゾリウム (NBT,和光純薬工業(株)製)、0.0165% 5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸 (BCIP、和光純薬工業(株)製) / 100mM Tris-HCl pH9.5 (100mM NaCl、5mM MgCl<sub>2</sub> 含有)

20

[蛋白質の固定化および測定]

- 実施例 1 と同様の方法で、上記した如く調製した固定化用試料を PVDF 膜にアブライシ、吸引濾過後、PBS (pH7.4) 300μL をアブライシ、同様に吸引濾過を行った。PVDF 膜を取り出し、ブロッキング溶液  
25 に浸し、ローテーションさせながら室温で 1 時間インキュベーションした（ブロッキング操作）。その後、発光検出用抗体溶液又は発色検出用抗

体溶液に浸し、ローテーションさせながら室温 1 時間インキュベーションした（抗体反応）。抗体反応後の膜を洗浄液で 5 回洗浄した後、発光検出試薬又は発色検出試薬に浸し、検出反応を行った。発光検出は、PVDF 膜を発光検出処理後、X 線フィルム（アマシャムバイオサイエンス製）に感光させて検出を行った。

#### [結果]

結果を図 8 に示す。図 8 に於いて、A は PVDF 膜に固定化した蛋白質試料の免疫検出を発光反応により行い、X 線フィルムに感光させ検出したものである。B は、PVDF 膜に固定化した蛋白質試料の免疫検出を発色反応により行い、検出したものである。また、各ドットは、蛋白質試料を各蛋白質量として固定化後に検出した場合の結果を夫々示す。

図 8 より明らかな如く、イムノブロッティングにより発光検出、発色検出した場合の何れも、膜に固定化したマウス IgG を検出することができた。発光検出での検出限界は  $0.0625 \mu\text{g}$ 、発色検出での検出限界は  $0.5 \mu\text{g}$  であった。従って、本発明の蛋白質の固定化方法により固定化すれば、高感度の免疫検出（イムノブロッティングによる検出）が行い得ることが判った。

#### 20 実施例 11

##### [異常型 PrP を含有する被検試料の調製]

（1）試液の調製：下記試液を調製した

##### ①ホモジナイズ用溶液

50mM Tris-HCl pH7.4(150mM NaCl, 1mM KCl, 1mM EDTA, 1W/V% デオキシコール酸ナトリウム、1W/V% Triton X-100 含有)

##### ②プロテアーゼ溶液

プロテイナーゼK (*Tritirachium album* 由来、和光純薬工業(株)製)  
300  $\mu$ g を 10mM Tris-HCl pH7.4(150mM NaCl、1mM KCl、1mM EDTA、  
20W/V% SDS、10W/V% Triton X-100 含有) 1 mL に溶解したもの。

③蛋白質沈降剤

- 5 2-ブタノール：メタノールの 5 : 1 (W/W)混合溶媒

④沈殿物溶解液

50mM Tris-HCl pH7.4(150mM NaCl、1mM KCl、1mM EDTA、  
0.005W/V% BSA、2W/V% SDS 含有)

(2) 異常型 PrP を含有する被検試料の調製

- 10 BSE 感染牛小脳 (凍結融解を繰り返したもの) 組織小片 320 mg  
(湿重量)をホモジナイズ用溶液 1.3ml 中でマルチビーズショッカー(安  
井器械(株)製)を用いてホモジナイズ後、20℃、5000g で 5 分間遠心分  
離を行い、上清を得た。

- 得られた上清 500  $\mu$ L にプロテアーゼ溶液 500  $\mu$ L を加え、37℃で 10  
15 分間反応させた後、蛋白質沈降剤 500  $\mu$ L を添加し混合させた。

次いで、この液を 20000g で 5 分間遠心分離を行い、沈殿物を得た。

得られた沈殿物に沈殿物溶解液 60  $\mu$ L を加えて溶解後、100℃で 5 分  
間処理し、プロテイナーゼKを失活させ、異常型 PrP の病原性を不活性  
化させた。

- 20 得られた溶液を異常型 PrP を含有する被検試料として用いた。

[異常型 PrP の固定化]

(1) 試液の調製

①固定化用試液 1

- 25 精製水で、0.1 W/V% SDS、2.5 W/V% TCA、45 V/V% エタノールを  
含有する固定化用試液 1 を調製した。

## ②固定化用試液 2

精製水で、0.1 W/V% Tween 20、2.5 W/V% TCA、45 V/V% エタノールを含有する固定化用試液 2 を調製した。

## ③異常型 PrP 固定化用試料

- 5 上記で調製した異常型 PrP を含有する被検試料 20  $\mu$ L と、固定化用試液 1 200  $\mu$ L を混合したもの (SDS 終濃度 0.27 W/V%、TCA 終濃度 2.3 W/V%、エタノール終濃度 41 V/V%) を調製し、異常型 PrP 固定化用試料とした。

## ④洗浄液

- 10 Tween 20 を、終濃度 0.05% となるように PBS[pH7.4、0.02V/V% スラオフ(日本インバイオミカス(株)商品名)含有]で希釈したものを用いた。

## ⑤抗体溶液

- 15 西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗 BSE モノクロナール抗体 (動物衛生研究所製) を PBS(pH7.4、20W/V% グリセロール、0.1W/V% BSA 含有)で 1/500 希釈したものを用いた。

## ⑥発色液

TMB Solution(和光純薬工業(株)製、マイクロウェル用)を用いた。

- ⑦停止液 0.1M HCl 水溶液を停止液として用いた。

## 20 【異常型 PrP の固定化および検出】

- 上記で調製した異常型 PrP 固定化用試料を PVDF 膜をセットしてあるマルチプレート (ミリポア社製) にアブライシ、10 分間静置後、吸引濾過した。次いで固定化用試液 2 100  $\mu$ L をアブライシ、同様に吸引濾過、更に洗浄液 300  $\mu$ L をアブライシ、同様に吸引濾過を行い、PVDF  
25 膜を洗浄し、この洗浄操作を再度行った。

その後、抗体溶液 50  $\mu$ L をアブライシ、20 分間反応させた。反応後、

洗浄液 300  $\mu$ L をアブライシ吸引濾過する操作を 5 回行い、PVDF 膜を洗浄した。

次いで、発色液 50  $\mu$ L をアブライシ、30 分間反応させた。

反応後、発色液を ELISA プレート吸引濾過し、停止液 50  $\mu$ L を添加して反応を停止させた後、マイクロプレートリーダー (Molecular Devices 製) にて、450nm の吸光度を測定した。

別に陰性コントロール (0.1W/V% BSA、0.02% スラオフを含有する PBS) と陽性コントロール [50mM Tris-HCl pH7.4、20  $\mu$ g/mL リコンビナント PrP (rPrP、広島大学から供与された)、150mM NaCl、1mM KCl、1mM EDTA、0.005W/V% BSA、2W/V% SDS 含有] を用いて同様に吸光度の測定を行った。結果を表 5 に示す。

#### 比較例 1 (従来の ELISA 法)

日本バイオ・ラッド ラボラトリーズ(株)製のプラテリア<sup>®</sup> BSE キットを用い、以下の通り、異常型 PrP の検出を行った。

##### [異常型 PrP を含有する被検試料の調製]

BSE 感染牛小脳 (凍結融解を繰り返したもの) 組織小片 350mg (湿重量) をホモジナイズ液 (グルコース 50mg/ml) 1.4mL 中でマリチビーズショッカーを用いてホモジナイズした。

得られたホモジネート 500  $\mu$ L にプロティナーゼ K (*Tritirachium album* 由来) を Reagent A 液、(尿素 0.12g/ml) で希釈したもの 500  $\mu$ L を加え、37°C で 10 分間反応させた。

次いで反応液に Reagent B 液 (8-ブタノール) 500  $\mu$ L を添加し、よく混和後、20000g で 5 分間遠心分離を行い、沈殿物を得た。

沈殿物に Reagent C1 液 (尿素 0.36g/ml) を添加して溶解し、100°C で 5 分間処理し、プロティナーゼ K を失活させ、異常型 PrP の病原性

を不活性化させた。

得られた溶液を異常型 PrP を含有する被検試料として用いた。

#### 【異常型 PrP の検出】

- 5     上記で調製した異常型 PrP を含有する被検試料 17  $\mu$ L を、希釈液 88  $\mu$ L に溶解し抗ヒト PrP マウスモノクローナル抗体を結合した 96 穴 ELISA 用プラスチックプレートのウェルに滴下した後、37℃で 75 分間静置した。次いで洗浄液 350  $\mu$ L で、ウェルを洗浄する操作を 6 回行った。

- 10    各ウェルに POD 標識抗ヒト PrP マウスモノクローナル抗体溶液 100  $\mu$ L を加え、4℃で 60 分間反応させた。

各ウェルを洗浄液(トリス緩衝液)で 10 回洗浄した。洗浄後、各ウェルに基質発色液(TMB 溶液) 100  $\mu$ L をアブライシ、30 分間反応させた。

- 15    反応後各ウェルに反応停止液(0.5M 硫酸) 100  $\mu$ L を加えて反応を停止させた。

マイクロプレートリーダー(Molecular Devices 製)にて、450nm の吸光度を測定した。

- 20    別に陰性コントロール(0.1W/V% BSA を含有する PBS)と陽性コントロール(ヒトプリオン蛋白合成ペプチド)を用いて同様に吸光度の測定を行った。結果を表 5 に併せて示す。

表 5

	吸光度		
	陰性対照	陽性対照	被検試料
実施例11	0.082	3.258	3.099
比較例1	0.072	1.500	0.385

表 5 から明らかな如く、実施例 1 1 においては固定化から検出までの工程を 6 0 分以内に行うことが出来たが、比較例 1 に於いては、蛋白質の固定化の段階のみで 75 分を要し、本発明の方法の方が、迅速に B S E 感染の判定を行うことが出来ることがわかる。

また、BSE 検体を用いた場合、比較例 1 では BSE 検体の吸光度は陽性対照よりもかなり低くなってしまい、凍結融解を繰り返した BSE 感染牛小脳を試料として用いた場合には、信頼度の高い BSE の判定が行えないことがわかった。これに対し、実施例 1 1 では陽性対照と同等の吸光度が測定され、検体の状態に関わらず BSE の判定が行えることがわかった。

#### 産業上の利用の可能性

- 15 本発明に係る蛋白質固定化方法によれば、従来の固定化方法よりも充分に蛋白質を固相に固定化できる。また、従来の固定化方法では正確に行えなかった蛋白質の定量も行うことができる。更に、本発明に係る蛋白質固定化方法を用いれば、イムノブロッティングを行った際の感度も高くなるという効果を奏する。
- 20 更に、本発明に係る異常型 PrP の検出方法によれば、より迅速且つ高精度で異常型 PrP を検出し、プリオン病（特に BSE）をより迅速に精度良く判定することができるという効果を奏する。

## 請 求 の 範 囲

1. 低級アルコールと、ハロゲノカルボン酸及び／又は長鎖アルキル硫酸塩の共存下で、蛋白質を、疎水性表面を有する固相と接触させることを特徴とする、当該蛋白質の当該固相への固定化方法。  
5
2. 低級アルコールとハロゲノカルボン酸と長鎖アルキル硫酸塩の共存下で、蛋白質を、疎水性表面を有する固相と接触させることを特徴とする、請求項1に記載の固定化方法。
3. 低級アルコールがエタノール又はメタノールである、請求項1に記載の固定化方法。  
10
4. ハロゲノカルボン酸がトリクロロ酢酸（以下、TCA と略記する。）又はトリフルオロ酢酸（以下、TFA と略記する。）である、請求項1に記載の固定化方法。
5. 長鎖アルキル硫酸塩がドデシル硫酸ナトリウム（以下、SDS と略記する。）である、請求項1に記載の固定化方法。  
15
6. 蛋白質と疎水性表面を有する固相とを接触させる際の低級アルコール濃度が、30～50 V/V%である、請求項1に記載の固定化方法。
7. 蛋白質と疎水性表面を有する固相とを接触させる際のハロゲノカルボン酸濃度が、0.08～10 W/V%である、請求項1に記載の固定化方法。
- 20 8. 蛋白質と疎水性表面を有する固相とを接触させる際の長鎖アルキル硫酸塩濃度が、0.1～1 W/V%である、請求項1に記載の固定化方法。
9. 固相が疎水性膜である、請求項1に記載の固定化方法。
10. 低級アルコールがエタノール又はメタノールであり、ハロゲノカルボン酸が TCA 又は TFA であり、長鎖アルキル硫酸塩が SDS である、  
25 請求項1に記載の固定化方法。
11. 蛋白質と疎水性表面を有する固相とを接触させる際の、低級アル



コール濃度が 30~50 V/V%であり、ハロゲンカルボン酸濃度が 0.08~10 W/V%であり、長鎖アルキル硫酸塩濃度が 0.1~1 W/V%であって、固相が疎水性膜である、請求項 10 に記載の固定化方法。

5 12. 請求項 1 の方法により蛋白質が固定化された固相に蛋白質染色液を接触させ、それにより生じた発色の程度に基づいて行うことを特徴とする、蛋白質の定量方法。

13. 請求項 1 の方法により蛋白質が固定化された固相を用いることを特徴とする、イムノブロッティング方法。

10 14. 異常型プリオン蛋白質を含有する被検試料を、請求項 1 の方法により処理して異常型プリオン蛋白質を当該固相に固定化させた後、異常型プリオン蛋白質に結合し得る抗体を反応させ、それにより生じた抗原抗体複合物の量を測定し、その結果に基づいて行うことを特徴とする、異常型プリオン蛋白質の検出方法。

15 15. 異常型プリオン蛋白質を含有する被検試料中の異常型プリオンを固相に結合させた後、固相に結合しなかった被検試料中の成分を吸引濾過により除去する、請求項 14 に記載の検出方法。

16. 請求項 15 に記載の吸引濾過の工程を行った後、非イオン性界面活性剤を含有する溶液で固相を洗浄する工程を更に追加して行う、請求項 14 に記載の検出方法。

20 17. 非イオン性界面活性剤を含有する溶液が、更に低級アルコール及びハロゲンカルボン酸を含有するものである請求項 16 に記載の検出方法

18. 抗体が標識物質で標識されたものである請求項 14 に記載の検出方法。

25 19. 異常型プリオン蛋白質に結合した標識抗体の標識物質の量を測定し、その結果に基づいて抗原抗体結合物の量を測定する請求項 18 に記

載の検出方法。

20. 標識物質が酵素であり、酵素免疫測定法により抗原抗体結合物の量を測定する、請求項19に記載の検出方法。

21. 異常型プリオン蛋白質と酵素標識抗体との抗原抗体複合物に、当該酵素に対する基質溶液を反応させて当該酵素の作用により発色反応を起こさせた後、基質溶液を吸引濾過により除去する、請求項20に記載の検出方法。

22. 下記工程により得られた異常型プリオン蛋白質を含有する動物組織由来試料を被検試料として用いる、請求項14に記載の検出方法。

10 1) 異常型プリオン蛋白質を検出すべき動物組織を界面活性剤の存在下に破碎処理する工程、

2) 不溶物を除去する工程、

3) 上清に分解酵素を加えて正常型 PrP を分解する工程、

4) 異常型プリオン蛋白質を沈降させる工程、

15 5) 沈降物を回収したのち、沈降物の溶液を得る工程、

23. 請求項14に記載の方法により異常型プリオン蛋白質を検出し、その結果に基づいて行う、プリオン病の判定方法。

24. 低級アルコールと、ハロゲノカルボン酸及び／又は長鎖アルキル硫酸塩とを含有する、蛋白質固定化用試液。

20 25. 低級アルコールとハロゲノカルボン酸と長鎖アルキル硫酸塩とを含有する、請求項24記載の試液。

26. 低級アルコールがエタノール又はメタノールである、請求項24記載の試液。

27. ハロゲノカルボン酸が TCA 又は TFA である、請求項24に記載の試液。

25

28. 長鎖アルキル硫酸塩が SDS である、請求項24に記載の試液。

29. 低級アルコール濃度が、30～50 V/V%である、請求項24に記載の試液。

30. ハロゲノカルボン酸濃度が、0.1～10 W/V%である、請求項24に記載の試液。

5 31. 長鎖アルキル硫酸塩濃度が、0.1～1 W/V%である、請求項24に記載の試液。

32. (1)低級アルコールと、ハロゲノカルボン酸及び／又は長鎖アルキル硫酸とを含有する固定化用試液1、(2)非イオン性界面活性剤を含有する固定化用試液2、及び(3)異常型プリオン蛋白質と特異的に結合し得る  
10 標識抗体、を構成試薬として含有してなる、異常型プリオン蛋白質検出用キット。

33. 固定化用試液2が、更に低級アルコール及びハロゲノカルボン酸を含むものである、請求項32に記載のキット。

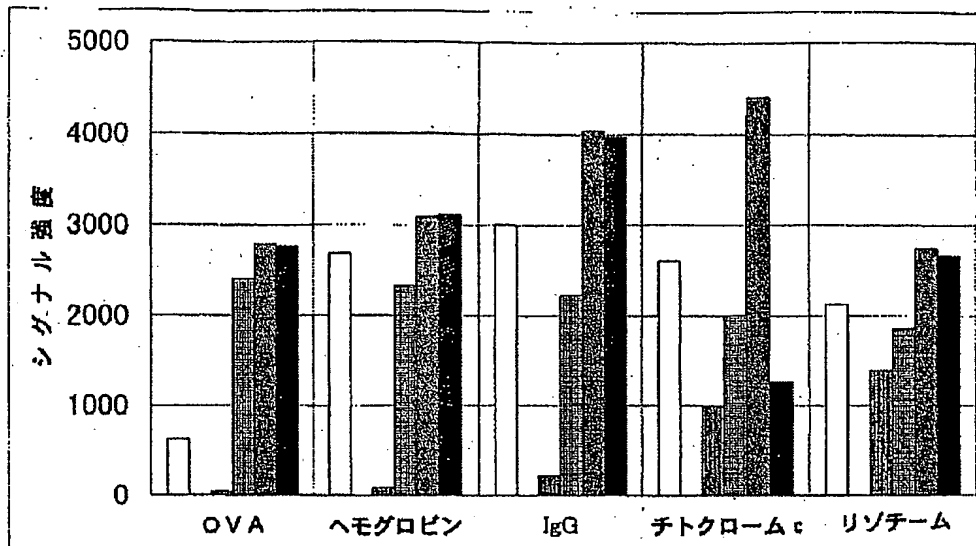
34. 標識抗体が酵素標識抗体である場合に、更に当該酵素の反応により  
15 検出可能なシグナルを発生し得る当該酵素の基質を構成試薬として含有して成る、請求項32に記載のキット。

## 要 約 書

- 従来の固相化法では容易に固定化できなかった試料中の蛋白質を固相に固定化でき、且つ試料中に共存する阻害物質の影響を軽減して蛋白質の定量的測定／検出を行うことができる固定化方法、それを用いた蛋白質の定量方法、イムノプロットング方法並びに蛋白質固定化用試液に関するものであり、「低級アルコールと、ハロゲンカルボン酸及び／又は長鎖アルキル硫酸塩の共存下で、蛋白質を、疎水性表面を有する固相と接触させることを特徴とする、当該蛋白質の当該固相への固定化方法及びそれに用いる固定化用試液。該固定化方法により蛋白質が固定化された固相に蛋白質染色液を接触させ、それにより生じた発色の程度に基づいて行うことを特徴とする、蛋白質の定量方法並びに該固定化方法により蛋白質が固定化された固相を用いることを特徴とする、イムノプロットング方法。」を提供する。
- 15 更に、従来よりも迅速且つ精度の高い異常型 PrP の検出方法及び BSE の判定方法を提供する。

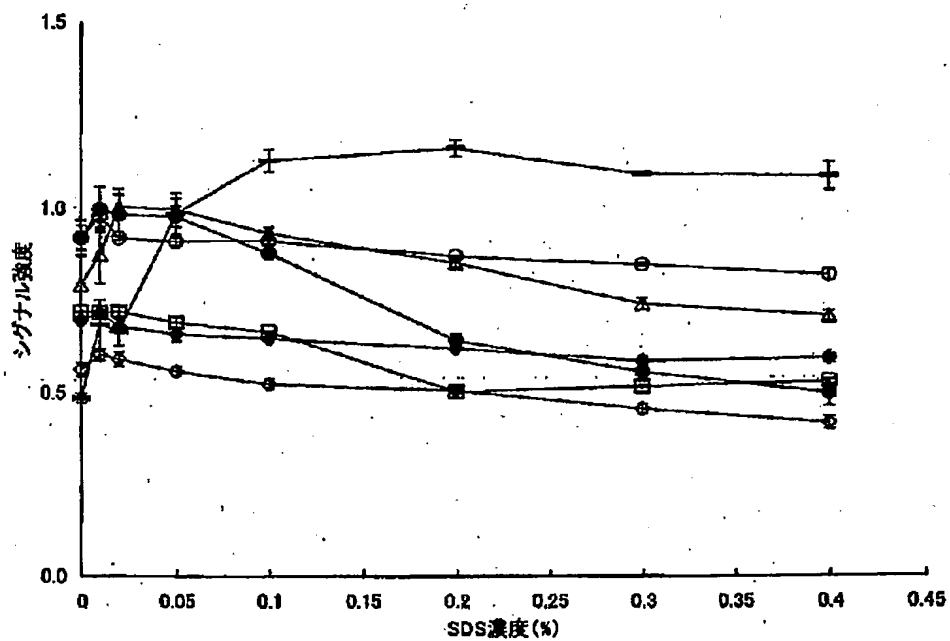
1/8

図 1



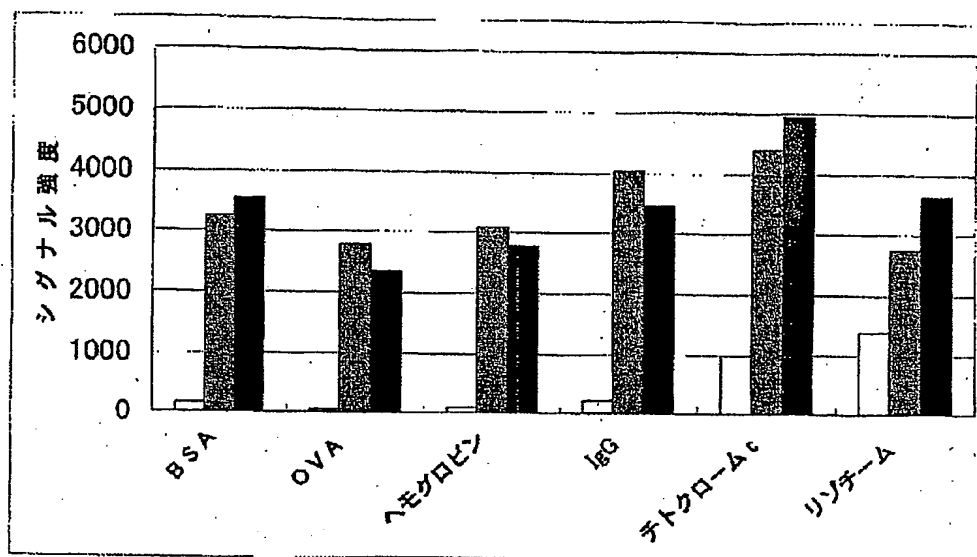
2 / 8

図 2



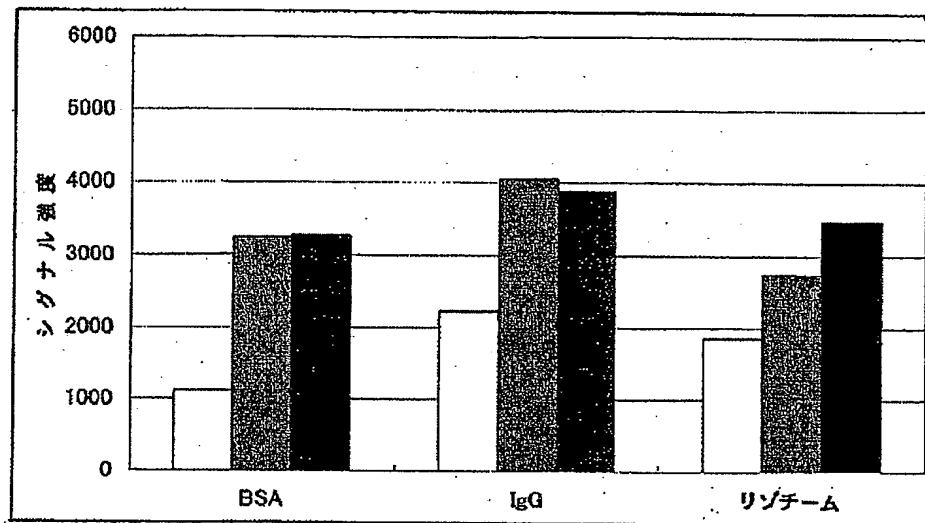
3/8

図 3



4 / 8

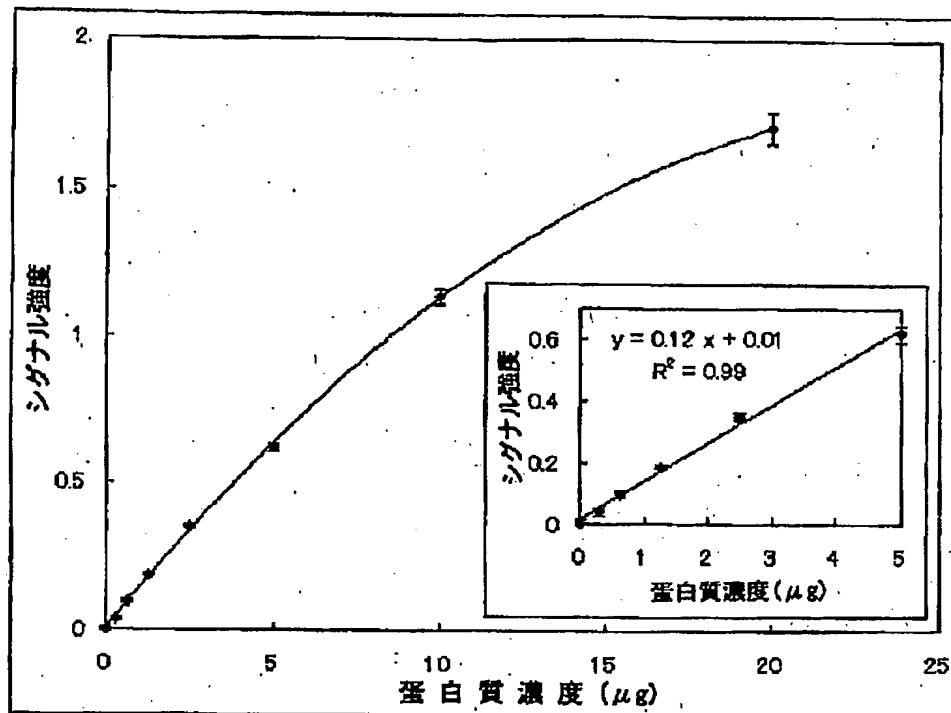
図 4





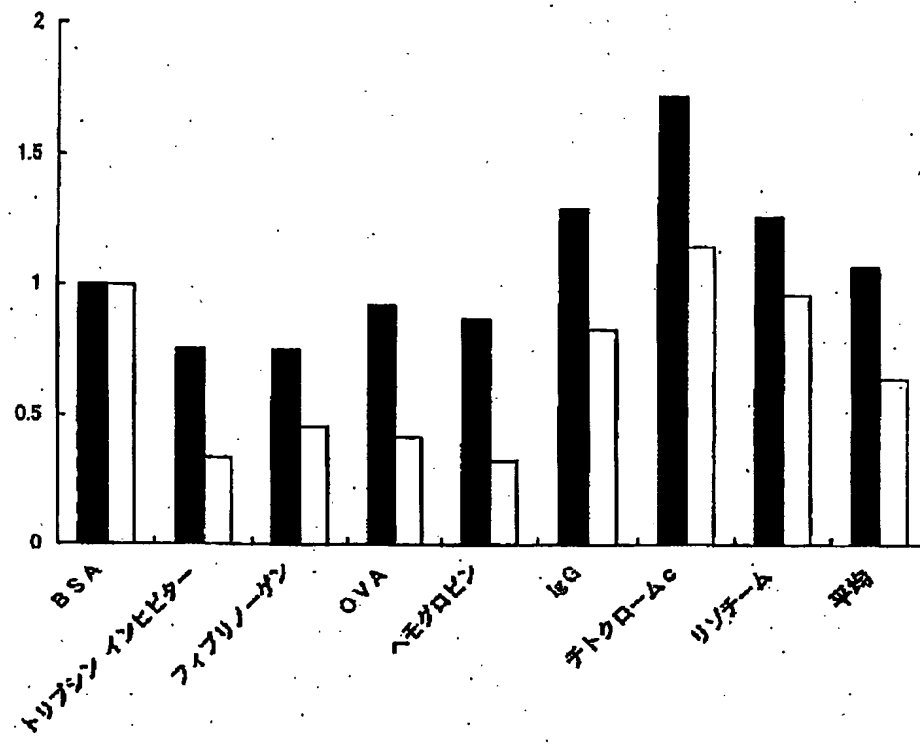
5/8

図 5



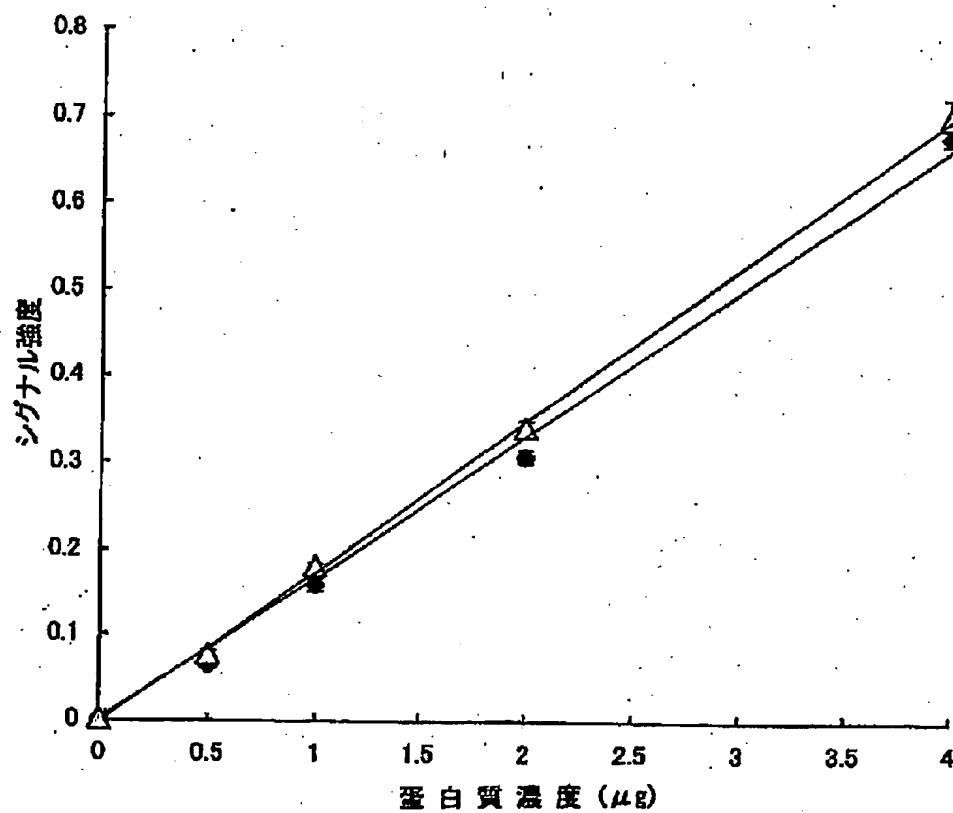
6/8

図 6



7/8

図 7



8 / 8

図 8

